

Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik

Direktor: Prof. David B. Jones (PhD M.I. Biol.)

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Philipps**



**Universität  
Marburg**

**Kraftanalyse an primären bovinen Osteoblasten  
nach mechanischer Belastung durch  
Scherspannung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Patrick Lebok**

(aus Braunschweig)

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität  
Marburg am: 25. April 2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. D.B. Jones

1. Korreferent: Prof. Dr. S. Ruchholtz

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Knochen als mechanosensibles System .....	2
1.2	Tiermodell und Zellkultur .....	4
1.3	Kräfte im Knochen und Belastung im Experiment .....	4
1.4	Mechanotransduktion .....	6
1.4.1	Primäres Zilium .....	6
1.4.2	Ionenkanäle .....	7
1.4.3	Extrazelluläre Matrix, Integrine und assoziierte Proteine .....	8
1.4.4	Zytoskelett und Myosin II .....	9
1.4.5	Elastizität der Anheftungsfläche .....	12
1.5	Intrazelluläre Signalkaskade .....	13
1.5.1	Extracellular signal-regulated kinase .....	13
1.5.2	Kalzium .....	13
1.5.3	G-Proteine .....	14
1.5.4	Stickstoffmonoxid .....	15
1.5.5	Wnt/ $\beta$ -Catenin .....	15
1.6	Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7 .....	15
1.7	Zellkräfte .....	16
1.8	Klinischer Bezug .....	16
1.9	Zielsetzung .....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1	Polyacrylamidgele für die Zugkraftmikroskopie .....	20

2.1.1	Vorbehandlung der Objektträger für die Gelbeschichtung .....	20
2.1.2	Herstellung der Polyacrylamidgele .....	21
2.1.3	Kollagenbeschichtung der Gele .....	23
2.1.4	Messung des Elastizitätsmoduls der Gele .....	24
2.2	Zellkultur .....	27
2.2.1	Gewinnung primärer boviner Osteoblasten .....	28
2.2.2	Ablösen der Zellen, Zellzählung und Passagieren .....	28
2.2.3	Kryokonservierung .....	29
2.2.4	Aussäen der Zellen .....	30
2.2.5	Phänotypisierung der Osteoblasten .....	30
2.3	Zugkraftmikroskopie .....	31
2.3.1	Berechnung der Deformationsmatrix .....	33
2.3.2	Ursprungsknoten der Kraftvektoren innerhalb der Zelle .....	35
2.3.3	Berechnung der Kraftvektoren .....	35
2.3.4	Visualisierung der Kraftvektoren .....	35
2.4	Grundzüge der Strömungslehre .....	37
2.4.1	Berechnung der Scherspannung .....	37
2.4.2	Ausbildung einer laminaren Strömung .....	40
2.5	Versuchsaufbau .....	42
2.5.1	Mikroskop und Lichtquellen .....	42
2.5.2	Kamera .....	43
2.5.3	Parallelfusskammer und Flüssigkeitsreservoir .....	43
2.5.4	Durchführung der Versuche .....	46
2.6	Statistische Auswertung .....	47

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1	Zellfläche .....	48
3.2	Kraftverteilung in der Kontrollgruppe .....	50
3.3	Kraftverteilung in der Versuchsgruppe.....	51
3.4	Auswertung der Kraftmittelwerte.....	52
3.5	Gruppenbildung für die Reaktionstypen.....	54
3.6	Auswertung über die Zeit.....	56
3.7	Auswertung über die Zeit für die Reaktionstypen der Kontroll- gruppe .....	56
3.8	Auswertung über die Zeit für die Reaktionstypen der Versuchs- gruppe .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1	Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7.....	62
4.2	Primäre bovine Osteoblasten .....	64
4.3	Methodik.....	66
4.4	Ausblick .....	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XXV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AFM	atomic force microscope
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIS-Acrylamid	N,N'-Methylen-bis-Acrylamid
BSP	bone sialoprotein
cAMP	cyclic adenosinmonophosphate
CCD	charge-coupled device
CI	confidence interval
DAG	Diacylglycerol
DAP	death-associated protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fetal calf serum
FGF-2	fibroblast growth factor 2
GIMP	GNU image manipulation program
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

IP3	Inositoltriphosphat
LSAB	labelled (strept-)avidin biotin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells
ML-7	1-(5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride
MLCK	myosin light-chain kinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MscL	mechanosensitive channel of large conductance
OPN	Osteopontin
PBS	phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PSD	position sensitive detector
RANKL	receptor activator of nuclear- $\kappa$ B ligand
Ras	rat sarcoma protein
Rho	Ras homolog
RhoA	Ras homolog gene family, member A
ROCK	Rho-associated kinase
SD	standard deviation
SI	Système international
Src	Sarcoma
Sulfo-SANPAH	Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-phenylamino)hexanoate
TEMED	Tetramethylethyldiamin

Wnt	aus Wingless und Int-1
ZIP	Zipper interacting protein

### Einheiten

°C	Grad Celsius
dyn	Dyne
IE	internationale Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration (Mol pro Liter)
N	Newton
N	Äquivalentkonzentration
Pa	Pascal
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
Strain	Strain



# 1 Einleitung

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das zeitlebens einer Erneuerung der Struktur unterliegt (Cohen, 2006; Rucci, 2008). Dies geschieht einerseits, um eine stabile Kalziumhomöostase zu gewährleisten. Andererseits wird die Knochenstruktur den wechselnden Anforderungen durch mechanische Belastung gerecht, indem das Verhältnis von Stabilität zu Masse optimiert wird (Pauwels, 1965; Roux, 1895; Rucci, 2008). Dieser Vorgang wird als „Remodeling“ bezeichnet und stellt eine komplexe Interaktion zwischen den knochenaufbauenden und knochenabbauenden Zellen dar (Zaidi, 2007). Zu diesen Zellen zählen die knochenaufbauenden Osteoblasten und deren Gegenspieler, die knochenabbauenden Osteoklasten. Osteoblasten entwickeln sich aus einer periostalen, pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzelle und synthetisieren die Knochenmatrix. Osteoblasten differenzieren entweder zu den inaktiven bone lining cells (Hemiosteozyten), die an der Knochenoberfläche persistieren, oder zu Osteozyten (Lorenzo et al., 2010). Die Fähigkeit der Zelle knochenspezifische Proteine zu synthetisieren nimmt während der Differenzierung von der Vorläuferzelle zum reifen Osteoblast zu. Für die Phänotypisierung von Osteoblasten in Zellkulturen eignen sich die Proteine Osteocalcin, bone sialoprotein (BSP) und Kollagen I (Aubin, 2001).

In der mineralisierten Knochenmatrix bilden die in Lakunen eingelagerten Osteozyten über Kanalikuli ein Netzwerk aus Zellfortsätzen mit interzellulären Adhäsionen (gap junctions) aus (Doty, 1981). Dieses lakunokanalikuläre System des Knochens ist Grundlage für die Theorien mechanischer Kräfte, die auf Knochenzellen wirken.

Im Gegensatz zu den Osteoblasten entwickeln sich Osteoklasten aus Vorläuferzellen des mononukleären Phagozytensystems des Knochenmarks (Quinn et al., 1996). Die mehrkernigen Zellen bauen Knochensubstanz in

Resorptionslakunen durch enzymatische Verdauung in einem sauren Milieu ab (Bar-Shavit, 2007).

Seit den ersten Forschungsarbeiten zu den Anpassungsreaktionen von Knochen (Wolf, 1892) sind zahlreiche Regelkreisläufe für die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten beschrieben worden (Zaidi, 2007). Dennoch sind die Mechanismen für den Erhalt der Integrität des Skelettsystems noch nicht vollständig aufgeklärt.

Einer dieser Regelkreisläufe wird über die mechanische Stimulation als Ausgangsgröße bestimmt. Die sogenannte Mechanotransduktion ist Gegenstand dieser Arbeit und wird in den nächsten Abschnitten weiter erörtert. Auf andere Regelkreisläufe (Zell-Differenzierung, Osteozyt-Osteoblast-Osteoklast-Interaktion, hormonelle Stimulation, zentralnervöse Regulation sowie Modulation durch das Immunsystem) wird aufgrund der Komplexität und der nicht unmittelbaren Relevanz für diese Untersuchung nicht eingegangen.

### **1.1 Knochen als mechanosensibles System**

Eine Anpassung der Knochenstruktur kann durch mechanische Belastung hervorgerufen werden. Der Zusammenhang zwischen mechanischer Belastung sowie Knochenfestigkeit und -form wurde bereits 1892 durch Wolf in seiner Abhandlung „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ beschrieben (Wolf, 1892) und durch Frost mit dem Mechanostat-Modell weiter aufgeklärt (Frost, 1987). Frost beschreibt in diesem Modell vier Belastungsbereiche. Bei physiologischen Belastungen zwischen 50 bis 200  $\mu\text{Strain}$  und 1500 bis 2500  $\mu\text{Strain}$  wird genau so viel Knochensubstanz resorbiert wie diese neu gebildet wird (1000  $\mu\text{Strain}$  entsprechen einer Längenänderung durch Dehnung um 0,1 %). Belastungen unter 50 bis 200  $\mu\text{Strain}$  führen zu einem erhöhten Knochenabbau wohingegen Belastungen über 1500 bis 2500  $\mu\text{Strain}$  zu einem vermehrten Knochenwachstum und einer größeren Knochensteifigkeit führen. Eine Überbelas-

tung mit über 4000 bis 5000  $\mu$ Strain führt zu keiner weiteren Erhöhung der Knochensteifigkeit und kann eine Deformation des Knochens hervorrufen.

Untersuchungen am Menschen belegen das Modell von Frost: Bei Tennisspielern wurde eine trainingsbedingte Zunahme der Knochenmasse beobachtet (Haapasalo et al., 2000; Jones et al., 1977). Verlust an Knochenmasse bei Unterbeanspruchung durch Aufenthalte in Schwerelosigkeit (Baldwin et al., 1996; Carmeliet et al., 2001) oder Bettlägerigkeit (Gross et al., 1995) wurden beschrieben.

Grenzen des Modells liegen in der Komplexität der Anpassungsprozesse des Knochens mit den zahlreichen, teils von mechanischer Belastung unabhängigen, Regelmechanismen. Die Umbauvorgänge hängen ferner nicht nur von der Belastungsintensität ab, sondern auch von der Frequenz, der Änderungsgeschwindigkeit und Dauer der Belastungszyklen (Robling et al., 2000; Rubin et al., 2004; Skerry, 2006).

Untersuchungen an Mäusen zeigten weiterhin, dass genetische Faktoren für die Mechanosensibilität des Knochens mitverantwortlich sind. Bei mechanischer Belastung der Tibia durch Sprungübungen zeigte ein B6 Mausstamm eine größere Zunahme der periostalen Knochenmasse im Vergleich zum C3H Mausstamm (Kodama et al., 2000). Tavella et al. konnten in Pleiotrophin-transgenen Mäusen nach einem Aufenthalt in Schwerelosigkeit einen geringeren Verlust an Knochenmasse nachweisen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Tavella et al., 2012).

Ferner reagieren Osteoblasten nicht nur auf Dehnung und Scherspannung als mechanischen Stimulus. Durch Untersuchungen mit gepulsten Ultraschallwellen an osteoblastären MC<sub>3</sub>T<sub>3</sub>-E<sub>1</sub>-Zellen konnte eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und eine gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration nachweisen werden (Zhang et al., 2012). Diese Ergebnisse deuten auf eine von der Stimulationsart unabhängige Mechanosensibilität von Knochengewebe hin.

### 1.2 Tiermodell und Zellkultur

Der Nachweis, dass Knochengewebe sowie die einzelnen Knochenzellen unabhängig von angrenzenden Geweben (Blutgefäße, Muskeln, Nerven) auf mechanische Stimulation reagieren, konnte durch Untersuchungen am Tiermodell und an Zellkulturen erbracht werden.

Bereits 1939 untersuchte Glücksmann den Einfluss mechanischer Belastung auf Knochengewebe *in vitro* (Glücksmann, 1939). An der Ulna von Vögeln zeigten Lanyon et al. eine vermehrte Knochenbildung nach dynamischer Belastung im Vergleich zu einer statischen Belastung (Lanyon et al., 1984). Robling et al. stellten einen Zusammenhang zwischen der Belastungsfrequenz und der Osteogenese her (Robling et al., 2000).

Auf zellulärer Ebene zeigen sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten mechanosensible Eigenschaften. Jones et al. konnten in Osteoblasten nach Dehnung eine Aktivierung der Phospholipase C nachweisen (Jones et al., 1987) und Reich et al. einen Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) nach Belastung mit Scherspannung (Reich et al., 1990). In Osteozyten wurden nach mechanischer Stimulation Prostaglandin (Ajubi et al., 1996) und Prostazyklin (Rawlinson et al., 1991) nachgewiesen. Eine vergleichende Untersuchung zwischen Osteoblasten und Osteozyten zeigte bei Osteozyten ein besseres Ansprechverhalten auf mechanische Stimulation (Ajubi et al., 1996). Ferner wurden Zellantworten durch mechanische Stimulation in ossären Vorläuferzellen sowie in Osteoklasten beschrieben (Wiltink et al., 1995).

Zusammenfassend besitzt wohl jeder Zelltyp im knöchernen System mechanosensible Eigenschaften. Dies lässt auf ein komplexes Kommunikationssystem zwischen den Zelltypen schließen (Jones et al., 1995).

### 1.3 Kräfte im Knochen und Belastung im Experiment

In vivo wirken bei Belastung (aufrechter Gang, Bewegung) Kräfte auf das Skelettsystem. Für die experimentellen Versuchsanordnungen geht man

davon aus, dass hierbei Deformierungen hervorgerufen werden, die zu Druck- und Zugkräften führen. Ferner werden Scherspannungen durch Flüssigkeitsbewegungen im lakuno-kanalikulären System angenommen (Rubin et al., 2006b).

Neben der direkten Dehnung einzelner Zellen durch Belastung des gesamten Knochens wird auch eine scherspannungsinduzierte Dehnung der extrazellulären Matrix (ECM) im lakuno-kanalikulären System postuliert (Han et al., 2004).

Im Knochen befindet sich freie Flüssigkeit, die durch mechanische Belastung, einem Druckgradienten folgend, im lakuno-kanalikulären System zu Scherspannungen führen kann (Dillaman et al., 1991; Piekarski et al., 1977). Hierbei werden zyklische Flüssigkeitsbewegungen mit wechselnden Scherspannungsspitzen in den Belastungsphasen angenommen (Cowin et al., 1995; Kufahl et al., 1990; Weinbaum et al., 1994). Belege für eine solche Flüssigkeitsverschiebung in vivo stehen jedoch noch aus. Wie groß die tatsächliche Scherspannung an einer Zelle ist, kann nur geschätzt werden. Weinbaum et al. und Wang et al. gehen bei einer theoretischen Porengröße im lakuno-kanalikulären System von etwa 7 nm von Scherspannungen zwischen 8 und 30 dyn/cm<sup>2</sup> aus (Wang et al., 2004; Weinbaum et al., 1994).

Für die Belastung von Zellen mit einer Scherspannung wird im Experiment die Parallelfusskammer verwendet. Die klassische Bauform mit einem rechteckigen Flusskanal (parallel angeordnete Wände) wurde durch Hochmuth et al. für Versuche an Erythrozyten beschrieben (Hochmuth et al., 1973). Diese Bauform bietet den Vorteil einer gleichbleibenden Scherspannung über die Kammerlänge. Die durch Usami (Usami et al., 1993) modifizierte Kammer ermöglicht einen Scherspannungsgradienten über die Kammerlänge und wurde von Rieger für seine Scherspannungsuntersuchungen an Osteoblasten benutzt (Rieger, 2004).

### 1.4 Mechanotransduktion

Als Mechanotransduktion wird die Fähigkeit einer Zelle beschrieben, einen an der Zelloberfläche anliegenden mechanischen Stimulus in das Zellinnere zu übertragen und in eine biochemische Antwort umzuwandeln. Die Transduktion ist ein Mehrschrittprozess und kann nach Duncan et al. in vier Abschnitte unterteilt werden (Duncan et al., 1995). Der Stimulus muss erkannt und in ein biochemisches Signal umgewandelt werden. Es folgt die intrazelluläre Signalweiterleitung, die in einer Zellantwort resultiert. Als Zellantworten nach mechanischer Stimulation werden die Zelldifferenzierung (Li et al., 2004), Proliferation (Kaspar et al., 2002; Li et al., 2004), Migration/Orientierung (Dembo et al., 1999; Lo et al., 2000) sowie die Proteinbiosynthese (Toma et al., 1997; You et al., 2001) beobachtet.

Um einen mechanischen Stimulus zu erkennen, muss die Zelle über Mechanorezeptoren verfügen. In Osteoblasten wurde bislang kein einzelner Rezeptor gefunden, der die vielfältigen beobachteten intrazellulären Antworten hervorruft. Durch die unterschiedlichen Stimulationsarten erscheint es wahrscheinlich, dass ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren mit einer gemeinsamen Endstrecke erfolgt (Ingber, 2006; Rubin et al., 2006b).

#### 1.4.1 Primäres Zilium

Das primäre Zilium ist eine solitäre, nicht bewegliche mikrotubulibasierte Zellorganelle, die an humanen Zellen bereits 1898 von Zimmermann beschrieben wurde (Zimmermann, 1898). Neben der Funktion als G-Protein vermittelter chemo- und photosensitiver Rezeptor in olfaktorischen Neuronen (Krieger et al., 1994) und der Retina (Elias et al., 2004) wird das primäre Zilium als Mechanosensor diskutiert. Praetorius et al. zeigten an der Nierenzelllinie MDCK einen Kalziumeinstrom in die Zelle nach Verformung des primären Ziliums und belegten damit die Eigenschaft als extrazellulären Mechanosensor (Praetorius et al., 2001). Sowohl in Osteoblasten als

auch in Osteozyten sind primäre Zilien nachgewiesen worden (Tonna et al., 1972; Xiao et al., 2006). Mechanosensitive Eigenschaften des primären Ziliums in Osteoblasten wurden durch Malone et al. belegt. Die mechanische Stimulation von Osteoblasten ohne Zilium durch eine oszillatorische Flüssigkeitsströmung führte zu einem fehlenden Anstieg von Osteopontin-mRNA (Malone et al., 2007). Welche intraziliären Strukturen und intrazellulären Kaskaden bei der Mechanotransduktion durch das primäre Zilium beteiligt sind, ist Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei Kalziumkanäle unter Beteiligung des zyklischen Adenosinmonophosphats diskutiert werden (Hoey et al., 2012; Kwon et al., 2010).

### 1.4.2 Ionenkanäle

Durch Dehnung der Zelloberfläche wurden Kationenkanäle als mechanosensitive Strukturen in Muskelzellen identifiziert (Guharay et al., 1984). Weitere Untersuchungen stellten den mechanosensitive channel of large conductance (MscL) im Bakterium *Escherichia Coli* als mechanosensiblen Rezeptor dar, der eine Dehnung der Zelloberfläche durch osmotischen Druck registriert (Sukharev et al., 1997).

In osteoblastenähnlichen Osteosarkomzellen konnte an nichtselektiven Kationenionenkanälen eine erhöhte Leitfähigkeit der gesamten Zelloberfläche nach Dehnung beobachtet werden (Duncan et al., 1994). Charras et al. zeigten, dass in Osteoblasten eine Dehnung von 800 % nötig ist, um die Hälfte mechanosensibler Ionenkanäle zu öffnen (Charras et al., 2004). Scherspannungsbelastungen führen abhängig von mechanosensiblen Ionenkanälen zu erhöhten intrazellulären Kalziumwerten und sind somit an der Mechanorezeption beteiligt (Ryder et al., 2001). Unabhängig von der Belastungsmethode wurden Änderungen der Membranpolarisierung beschrieben, die zu einer konsekutiven Rekrutierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt (Li et al., 2002).

### 1.4.3 Extrazelluläre Matrix, Integrine und assoziierte Proteine

Die extrazelluläre Matrix (ECM) dient der Zelle als Haftungsuntergrund und wird durch mechanische Belastung umstrukturiert. Yang et al. zeigten eine gesteigerte Kollagenase-3-Expression durch Osteoblasten nach Dehnung (Yang et al., 2004). Chiquet et al. konnten eine gesteigerte Kollagenexpression an gedehnten Fibroblasten nachweisen (Chiquet et al., 2003). Bei Fibroblasten, die kein Fibronectin als extrazelluläres Matrixprotein synthetisieren konnten, zeigten Lutz et al. eine fehlende Zellantwort durch mechanische Stimulation (Lutz et al., 2010).

Fokale Adhäsionen sind Bindungsstellen der Zelle zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix und bestehen aus Integrinen und zahlreichen Adapterproteinen. Integrine sind transmembranöse Proteinstrukturen, die zur bidirektionalen Signalübermittlung zwischen extrazellulärer Matrix und Zellinnerem dienen. Von außen nach innen wird durch Bindung an extrazelluläre Liganden die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst. In umgekehrter Richtung übertragen sich innerzelluläre Prozesse auf die extrazelluläre Matrix (Schwartz, 2010). Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\beta$ 1-Untereinheit in Osteoblasten und Osteozyten stellt die funktionell prädominante Struktur dar (Hughes et al., 1993; Zimmerman et al., 2000). Für  $\beta$ 1 sind Kollagen Typ I und III sowie Fibronectin als extrazelluläre Liganden beschrieben. Auf zytoplasmatischer Seite bindet  $\beta$ 1 über zahlreiche Adapterproteine (Talin, Paxillin, Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin unter anderem) an das Zytoskelett (siehe Abbildung 1). Die fokale Adhäsionskinase (FAK) ist für diesen Zusammenschluss essentiell. Das durch die FAK phosphorylierte  $\alpha$ -Aktinin bindet an Vinculin und Aktinfilamente und stabilisiert die entstandene fokale Adhäsion (Mitra et al., 2005).

Für Integrine und die fokale Adhäsionskinase konnten mechanosensible Eigenschaften nachgewiesen werden (Puklin-Faucher et al., 2009; Salter et al., 1997). Als Teil der Signalkaskade wurde hier die mitogen-activated protein kinase (MAPK) aktiviert (Schlaepfer et al., 1999).



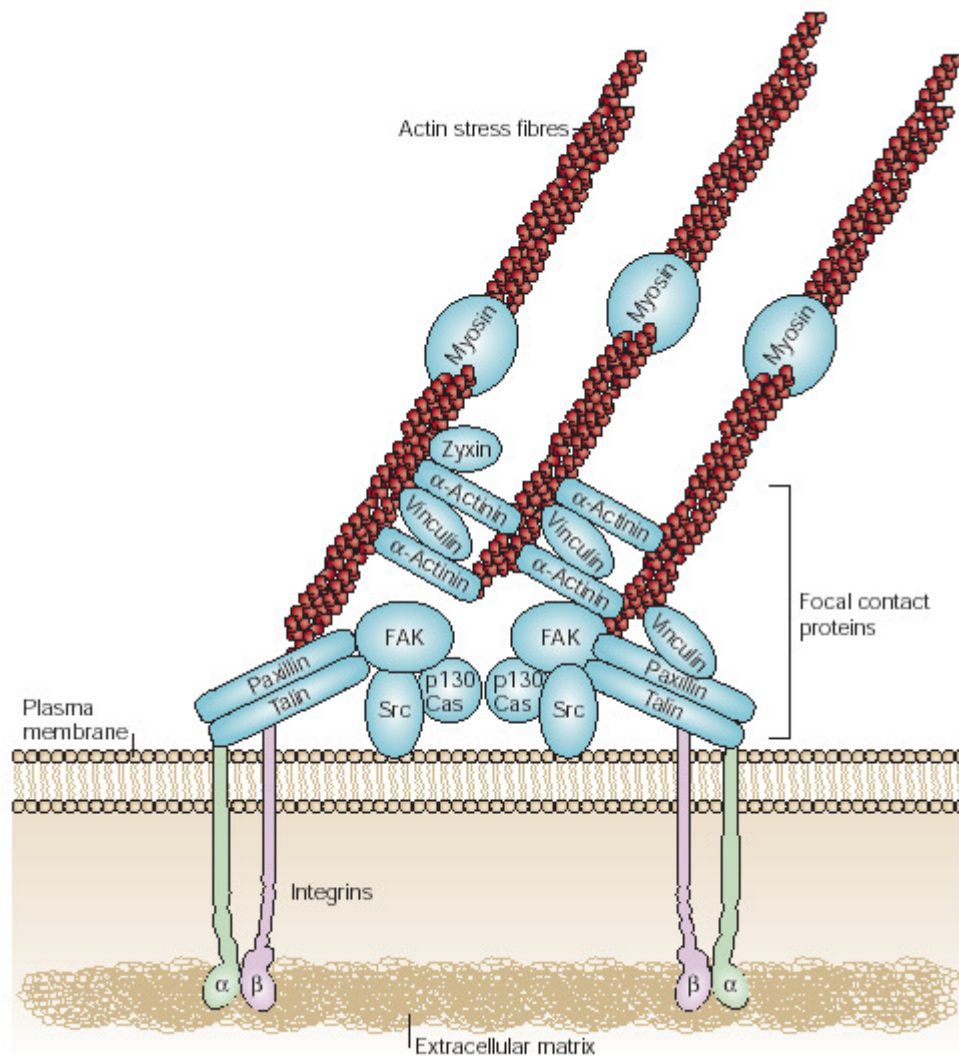


Abbildung 1: Fokale Adhäsion. Integrine, die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Adapterproteine stellen eine Bindung zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskelett her (Mitra et al., 2005).

### 1.4.4 Zytoskelett und Myosin II

Das Zytoskelett besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Es ist für die Zellform verantwortlich und an der Zellbewegung und -haftung beteiligt. Ingber führte das sogenannte Tensegrity-Modell (aus Tension und Integrity) ein, das die Zelle als spannungsgeladenen Komplex mit dem Zytoskelett als tragende Struktur beschreibt (Ingber,

1997). Die Spannung des Zytoskeletts wird durch Aktin-Myosin-Komplexe (Aktin-Stressfasern) aufgebaut.

Das nichtmuskuläre Myosin II ist ein aktinabhängiges Motorprotein, das aus zwei Schwereketten, zwei essentiellen Leichtketten und zwei regulatorischen Leichtketten besteht (Mabuchi et al., 1977; Sellers, 2000). Die Phosphorylierung der regulatorischen Leichtkette an Threonin 18 und Serin 19 bestimmt dabei die Aktivität des Myosin II (Somlyo et al., 2003). Die Phosphorylierung erfolgt über die Myosin-Leichtketten-Kinase (Kamm et al., 1985) und die Rho-Kinase/ROCK (Amano et al., 1996). Weitere Kinasen wie die Zipper interacting protein (ZIP)-Kinase (Murata-Hori et al., 1999) und die death-associated protein (DAP)-Kinase (Kawai et al., 1999) sind für die Phosphorylierung der regulatorischen Leichtkette beschrieben.

Nach Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette kann Myosin an Aktin binden und einen Querbrückenzyklus zum Kraftaufbau durchführen. Hierbei bindet Adenosintriphosphat (ATP) an nicht gebundenes Myosin. Durch die Myosin-ATPase wird ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat hydrolysiert, was eine Konformationsänderung des Myosinkopfes bewirkt. Phosphat wird abgespalten, der Myosinkopf bindet an Aktin, der Kraftschlag wird durchgeführt und ADP dissoziiert. Wenn ATP zur Verfügung steht, löst sich der Myosinkopf vom Aktin, und der Zyklus beginnt erneut. Falls kein ATP verfügbar ist, bleibt der Myosinkopf in der Kontraktion am Aktin gebunden (Rigor-Stellung).

Ein möglicher Mechanismus für die myosinunabhängige Ausbildung einer Zellprotrusion ist das gerichtete Polymerisieren von Aktin (Cooper, 1991; Mogilner et al., 1996; Pollard et al., 2003). Das zugrundeliegende Modell wird als „Brown'sche Ratsche“ bezeichnet und beschreibt ein Ausnutzen der Brown'schen Molekularbewegung (siehe Abbildung 2). Vereinfacht dargestellt wird in der größten Auslenkung der Plasmamembran ein Aktinmonomer an das Aktinfilament gebunden und verhindert ein Zurückfallen der Basalmembran. Durch Wiederholung dieses Zyklus erfolgt ein gerichtetes Längenwachstum. Thermodynamisch ist dies

möglich, da die Polymerisationsenergie von Aktin durch ATP bereitgestellt wird und diese größer ist als die thermische Bewegungsenergie der Plasmamembran (Hill et al., 1982; Peskin et al., 1993).

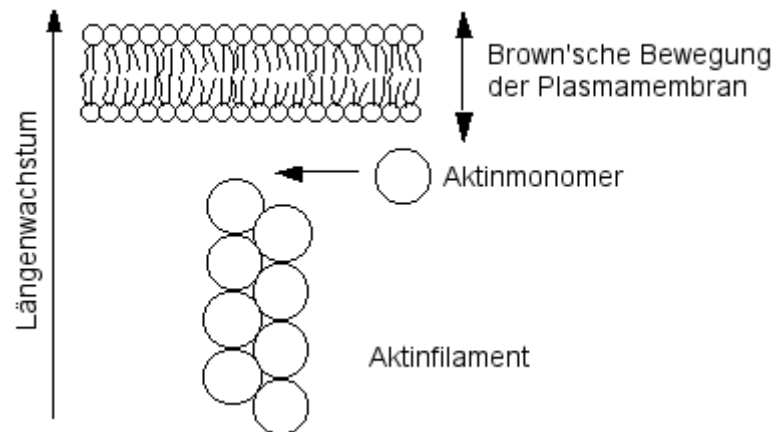


Abbildung 2: Brown'sche Ratsche. Durch Bewegung der Plasmamembran und Aktinpolymerisation kann ein Längenwachstum erfolgen (nach <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/lectures/CS3.htm>, aufgerufen am 28. März 2012).

Mikrotubuli sind als Bestandteil des Zytoskeletts an der Zellteilung und Zellbewegung beteiligt (Rappaport, 1986; Vasiliev et al., 1970). Dem Tensegrity-Modell nach sind Mikrotubuli druckbelastete Strukturen des Zytoskeletts, die den Zugkräften der Aktin-Stressfasern entgegenwirken. Versuche an humanen Glattmuskelzellen der Atemwege durch Stamenovic et al. bekräftigen diese Theorie (Stamenovic et al., 2002). In dieser Untersuchung konnte eine Erhöhung der Zellkräfte nach Störung der Mikrotubulipolymerisation durch Colchicin gezeigt werden.

Da das Zytoskelett über fokale Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix verbunden ist, werden diese intrazellulären Spannungen auf die extrazelluläre Matrix übertragen. Die erhöhte Zellsteifigkeit, die aus den Spannungen resultiert, hat Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften der Zelle. Druckbelastungen oder Scherspannung, die an

einem Zellende wirken, könnten sich ohne Zeitverzögerung auf entferntere Strukturen der Zellmembran oder den Kern ausbreiten (Ingber, 2003).

### **1.4.5 Elastizität der Anheftungsfläche**

Zellen können die Elastizität der Anheftungsfläche erfassen und entsprechende Anpassungsreaktionen initiieren. Die von der Zelle auf die Anheftungsfläche ausgeübte Spannung variiert mit der Steifheit der Anheftungsfläche. Demnach erzeugen Zellen auf steiferen Flächen mehr Spannung und zeigen die Tendenz, zu den steiferen Anteilen der Anheftungsfläche zu migrieren (Lo et al., 2000; Pelham et al., 1998). Dieses Phänomen wurde durch die Arbeitsgruppe um M. Dembo mit dem Begriff Durotaxis beschrieben und impliziert eine aktive Rezeption der Untergrundsteifigkeit. Neben der Zellmigration werden auch die Zelldifferenzierung (Engler et al., 2006) und die Proliferation (Wang et al., 2000) durch die Steifigkeit der Anheftungsfläche bestimmt. Kobayashi et al. zeigten sowohl eine Mitbeteiligung von mechanosensitiven Adapterproteinen und Aktinfilamenten in den fokalen Adhäsionen als auch eine Abhängigkeit von mechanosensitiven Kalziumkanälen für diesen Vorgang (Kobayashi et al., 2010). Wang et al. beschreiben eine Abhängigkeit von der fokalen Adhäsionskinase bei der Migration von Fibroblasten. Demnach führt ein Fehlen der fokalen Adhäsionskinase zu einem Verlust der Eigenschaft, die Steifigkeit des Untergrundes zu erfassen (Wang et al., 2001).

Die Durotaxis ist auch im Knochen ein entscheidender Faktor für die Zelldifferenzierung. Engler et al. bestimmten mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) den Elastizitätsmodul von Osteoid mit  $27\,000 \pm 10\,000 \text{ N/m}^2$  und beschreiben auf kollagenbeschichteten Gelen eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu osteoblastären Zellen bei Steifigkeiten der Gele ab  $25\,000 \text{ N/m}^2$  (Engler et al., 2006).

### 1.5 Intrazelluläre Signalkaskade

Die mechanische Belastung einer Zelle führt zu einer Zellantwort, die über eine intrazelluläre Signaltransduktion vermittelt wird. Als Endstrecke resultiert eine Regulierung von Transkriptionsfaktoren, um zum Beispiel eine Zellteilung einzuleiten oder Proteine zu synthetisieren. Bei der Mechano-transduktion in Knochenzellen sind wahrscheinlich alle bekannten Signalkaskaden beteiligt und zeigen eine Überschneidung der Kaskaden bei unterschiedlichen und gleichen mechanischen Stimulationsarten (Rubin et al., 2006b).

#### 1.5.1 Extracellular signal-regulated kinase

Die Aktivierung der extracellular signal-regulated kinase (ERK) durch mechanische Stimulation als Teil der mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Kaskade in Knochenzellen wurde durch Weyts et al. und You et al. beschrieben (Weyts et al., 2002; You et al., 2001). Diese wird für die Proteinsynthese (Yang et al., 2004) und Regulation der Proliferation (Boutahar et al., 2004) verantwortlich gemacht.

Die Aktivierung der MAPK- und ERK-Kaskade wird über das rat sarcoma protein (Ras) getriggert. Neben der fokalen Adhäsionskinase werden Integrine, Wachstumsfaktorrezeptoren, Ionenkanäle und G-Proteine als Auslöser diskutiert (Boyd et al., 2003; Jin et al., 2005; Schlaepfer et al., 1999).

#### 1.5.2 Kalzium

Für die Mechanotransduktion in Knochenzellen ist ein intrazellulärer Kalziumanstieg als Zellantwort beschrieben worden (Hung et al., 1995; Jones et al., 1987; Wadhwa et al., 2002). Die Kalziumkaskade wird durch eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) getriggert, wobei für mechano-sensitive humane Osteosarkomzellen die Isoform  $\beta 2$  der PLC für die Akti-

vierung verantwortlich gemacht wird (Hoberg et al., 2005). Die Aktivierung der Phospholipase C führt zu einer konsekutiven Aktivierung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), das die Kalziumantwort durch eine Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum verstärkt (Berridge, 1984). Zum anderen werden über die Phospholipase C, Inositoltriphosphat und Diacylglycerol (DAG) weitere Kaskaden über die Proteinkinase A (PKA) und die extracellular signal-regulated kinase aktiviert (Lopez et al., 2001; Ogasawara et al., 2001). You et al. beschreiben eine kalziumvermittelte Genregulation von Osteopontin nach Scherspannungsbelastung von Osteoblasten über die mitogen-activated protein kinase-Kaskade (You et al., 2001).

### 1.5.3 G-Proteine

G-Proteine stellen einen Zusammenschluss Guaninnucleotid bindender Proteine dar und konnten für die Auslösung von Signalkaskaden nach mechanischer Belastung verantwortlich gemacht werden. Zu den Kaskaden gehört eine Aktivierung des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) über der Phospholipase C und der mitogen activated-protein kinase (Carvalho et al., 1994; Jalali et al., 1998). Die Mitbeteiligung der G-Proteine rat sarcoma (Ras) und rat sarcoma homolog (Rho) in der Mechanotransduktion konnte nach mechanischer Belastung in Osteoblasten belegt werden (Hamamura et al., 2012; Rubin et al., 2006a). Ferner spielt Rho eine zentrale Rolle in der Formation von fokalen Adhäsionen und den kontraktilen Aktin-Myosin-Komplexen nach mechanischer Belastung (Chiquet et al., 2003; Chrzanowska-Wodnicka et al., 1996). Durch Rho wird die Rho-Kinase aktiviert sowie die Myosin-Phosphatase deaktiviert und somit die Myosin-Leichtkette phosphoryliert, was eine Aktin-Myosin-Interaktion ermöglicht (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996).

### 1.5.4 Stickstoffmonoxid

Smalt et al. wiesen nach mechanischer Stimulation Stickstoffmonoxid (NO) in Osteoblasten nach (Smalt et al., 1997). Effekte auf die Osteogenese durch NO wurden durch Ralston aufgezeigt (Ralston, 1997). Fan et al. zeigten, dass in Osteoblasten durch NO der receptor activator of nuclear- $\kappa$ B ligand (RANKL) hochreguliert wird (Fan et al., 2004). Dies ist ein bedeutender Faktor in der Osteoblast-Osteoklast-Kommunikation. Durch Bindung von RANKL an osteoklastäre Vorläuferzellen wird die Differenzierung zu Osteoklasten initiiert (Yasuda et al., 1998).

### 1.5.5 Wnt/ $\beta$ -Catenin

Wnt ist ein Signalprotein, das nach Bindung an den Wnt-Rezeptor zu einer Kaskade über die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor führt. Mechanosensible Eigenschaften dieses Signalweges konnten durch Scherspannungs- und Dehnungsexperimente an Osteoblasten nachgewiesen werden (Norvell et al., 2004; Robinson et al., 2006).

Sclerostin ist ein regulatorisches Protein für die Umbauprozesse des Knochens und wird von Osteozyten synthetisiert. Es bewirkt eine Inhibition der Osteoblastenaktivität und hemmt somit den Knochenaufbau (van Bezooijen et al., 2004). Der Mechanismus wurde durch Lin et al. beschrieben und zeigt eine Blockade des Wnt-Signalweges durch Sclerostin (Lin et al., 2009).

### 1.6 Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7

Die Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) kann durch ML-7 blockiert werden. Dies ist ein zu ATP kompetitiver, spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor der MLCK (Saitoh et al., 1987). Physiologisch bindet der Myosinkopf an ein Aktinfilament, um einen Kraftschlag durchzuführen. Hierfür muss zuvor die Leichtkette des Myosin II phosphoryliert wer-

den. Diese Phosphorylierung durch die MLCK wird durch ML-7 blockiert. Untersuchungen an Fibroblasten konnten durch die Inhibition der MLCK eine Störung der Aufrechterhaltung des Aktin-Stressfaser-Gerüsts und der fokalen Adhäsionen in der Zellperipherie belegen (Kato et al., 2001; Totsukawa et al., 2000). Morphologisch wurde bei Fibroblasten ein Rückgang an Lamellopodien und eine Verringerung der Zellsteifigkeit beobachtet (Schafer et al., 2005). In MCF-10A Epithelien führte eine Konzentration von 40  $\mu$ M ML-7 in einer Beobachtungszeit von 16 Stunden zu einer Apoptose (Connell et al., 2006).

### 1.7 Zellkräfte

Zellkräfte spielen eine kritische Rolle bei der Zellmigration und der Zelldifferenzierung. Im Zytoskelett werden Spannungen erzeugt und über die fokalen Adhäsionen teilweise an den Haftungsuntergrund übertragen. Harris et al. konnten durch Einsatz eines Untergrundes aus Silikon die wirkenden Zellkräfte durch Deformierung der Silikonunterlage darstellen (Harris et al., 1980). Dembo et al. benutzen in einer weiterentwickelten Methode elastische Polyacrylamidgele (Dembo et al., 1999). Mit dieser Methode untersuchten Dembo et al. Fibroblasten bei der Migration und konnten Zellkräfte bis 2000 nN messen. Curtze ermittelte mit der Methode von Dembo et al. an primären bovinen Osteoblasten Zellkräfte bis 660 nN (Curtze et al., 2004).

### 1.8 Klinischer Bezug

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Zellkräften als Teil von Regulationsmechanismen, die für die Integrität des Skelettsystems verantwortlich sind. Fehlregulationen führen zu einer Destabilisierung des Knochensystems und resultieren in Krankheiten wie der Osteoporose. Ein Mechanismus, der für den Erhalt der Knochenstruktur verantwortlich ist, wird durch mechanische Belastung gesteuert.



Bisherige Untersuchungen zu mechanisch belasteten Knochenzellen (Osteoblasten und Osteozyten) zeigten Zellantworten mit einer Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade und Änderung der Genexpression beziehungsweise der Proteinbiosynthese. Hierfür wurden Dehnung und Scherspannung als mechanischer Stimulus verwendet. Die beteiligten Strukturen für die Zellantwort sind jedoch nicht vollständig bekannt. Ein Glied in der Mechanotransduktion in Osteoblasten stellt das Zytoskelett mit der dort entstehenden Zellkraft dar.

Durch Untersuchung der Kraftverläufe an Osteoblasten mit modifiziertem Zytoskelett können weitere Erkenntnisse über die Mechanotransduktion gewonnen werden.

### **1.9 Zielsetzung**

Die Quantifizierung und der zeitliche Verlauf von Zellkräften in Osteoblasten unter Scherspannung erfolgten bislang in einer vorangegangenen Arbeit am Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik in Marburg. In dieser Untersuchung konnte Rieger einen Zusammenhang zwischen mechanischem Stimulus, intrazellulärem Kalziumanstieg und Kraftentwicklung in Osteoblasten darstellen (Rieger, 2004).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer Myosin II-abhängigen Entwicklung der Kraft in primären bovinen Osteoblasten. Nach Inkubation mit dem Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7 folgt in einer experimentellen Versuchsanordnung die mechanische Belastung durch eine Scherspannung. Morphologische Zellveränderungen werden mittels Phasenkontrastmikroskopie optisch registriert. Eine Erfassung der Zellkräfte erfolgt über die Methode der Zugkraftmikroskopie. Die Ergebnisse werden mit denen einer Kontrollgruppe verglichen.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien werden jeweils am Ende eines jeden Unterkapitels aufgeführt. Standardreagenzien und -geräte werden nicht gesondert erwähnt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

<b>Autoklav</b>	Guwina Berlin
<b>Begasungsbrutschrank</b>	Heraeus Instruments
<b>Deckgläser Ø 16 mm</b>	Menzel, Nr. CB00160RA1
<b>Objektträger 26 x 76 mm</b>	Menzel, Nr. AA00000102E
<b>Phasenkontrastmikroskop</b>	Olympus, CK2
<b>Sterilfilter 0,2 µm Porengröße</b>	Schleicher & Schuell
<b>Sterilisationsofen</b>	Heraeus Instruments
<b>Sterilwerkbank</b>	Gelaire BSB
<b>UV-Temperatur-Werkbank</b>	Edmund Bühler, TH2
<b>Zellkulturflasche 250 ml</b>	Greiner Bio-one
<b>Zellkulturflasche 50 ml</b>	Greiner Bio-one
<b>Zellkulturschalen Ø 14 cm</b>	Greiner Bio-one
<b>Zellzähler</b>	Schärfe System CASY 1
<b>Zentrifuge</b>	Hettich Universal

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

<b>50 mM HEPES Pufferlösung pH 8.5</b> 11,9 g HEPES N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] + 1 l ddH <sub>2</sub> O + Kaliumhydroxidpellets für die pH-Titrierung	Sigma, Nr. H3375
<b>Earle's Salzlösung</b> 100 ml Earle's Salzlösung 10x + 894 ml ddH <sub>2</sub> O + 6 ml 7,5 % NaHCO <sub>3</sub> Lösung + Antibiotikum nach Bedarf 500 000 IE Penicillin/Streptomycin 4 mg Amphotericin B	Biochrom, Nr. L 1925    PAA, Nr. P11-010 Sigma, Nr. A2942
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>	Biochrom, Nr. L 182-50
<b>Vitamin C Stammlösung</b> 50 mg L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate + 10 ml ddH <sub>2</sub> O	Wako, Nr. 13-12061

Tabelle 3: Verwendete Medien

<b>BGJb Medium</b> 900 ml ddH <sub>2</sub> O + 21,3 g BGJb Medium + 1,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> + 100 ml fetales Kälberserum (FCS) + 1 ml Vitamin C Stammlösung + 25 000 IE Penicillin/Streptomycin auf pH 7,2 titrieren	US Biological, Nr. 31091  Seromed, Nr. 615B  PAA, Nr. P11-010
<b>Ham's F10</b> 500 ml Ham's F10 + 5 ml 200 mM L-Glutaminlösung + 1 ml Vitamin C Stammlösung + 50 ml fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Nr. E15-014 PAA, Nr. M11-004  Seromed, Nr. 615B

### 2.1 Polyacrylamidgele für die Zugkraftmikroskopie

Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgte nach der durch Pelham et al. und Wang et al. beschriebenen Methode (Pelham et al., 1998; Wang et al., 1998). Für die Versuche in der Parallelfusskammer wurden die Gele auf einem Objektträger aufgebracht.

#### 2.1.1 Vorbehandlung der Objektträger für die Gelbeschichtung

Das für die Experimente verwendete Polyacrylamidgel haftet nicht auf glatten Glasunterlagen, weshalb eine Vorbehandlung der Objektträger erfolgte.

Für die Parallelfusskammer wurden die 26 x 76 mm großen Objektträger mit einem Glasschneider auf eine Länge von 60 mm gekürzt.

Nach Abflammen mit dem Bunsenbrenner und Waschen mit 0,1 N NaOH-Lösung wurden die Objektträger luftgetrocknet und 3-(Aminopropyl)trimethoxysilane aufgetragen. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten lang in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit 0,5 % Glutaraldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Überschüssiges Glutaraldehyd wurde durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten in destilliertem Wasser entfernt.

Tabelle 4: Materialien für die Objektträgerbehandlung

<b>3-(Aminopropyl)trimethoxysilane</b> $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$	Sigma, Nr. 281778
<b>0,5 % Glutaraldehyd</b> 20 ml Glutaraldehyd 25 % $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ + 980 ml PBS	Serva, Nr. 23115

### 2.1.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Um eine für die Versuche mit primären bovinen Osteoblasten geeignete Gelsteifigkeit mit einem Elastizitätsmodul von 4000 N/m<sup>2</sup> zu erzielen, wurde eine Mischung aus 8 % Acrylamid und 0,04 % BIS-Acrylamid hergestellt. Zu 2 ml der Acrylamidmischung wurden 6 µl der 0,5 µm und 15 µl der 0,2 µm durchmessenden fluoreszierenden Latexpartikel hinzugefügt. Nach Mischen mit dem Vortexer erfolgte die Vakuumentgasung des Gemisches für 10 Minuten, um ein blasenfreies Gel zu erhalten. Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 10 µl 10 %iger Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 1 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator gestartet. Nach Auftragen von 14 µl des noch flüssigen Gels

auf die vorbehandelten Objektträger wurde ein Deckglas mit einem Durchmesser von 16 mm darauf platziert. Mit nachfolgender Formel ergibt sich eine Gelhöhe von  $h \approx 70 \mu\text{m}$ .

$$h = \frac{V}{A} = \frac{V}{\pi \cdot r^2} \quad \begin{array}{ll} h & = \text{Gelhöhe (m)} \\ V & = \text{Gelvolumen (m}^3\text{)} \\ A & = \text{Gelfläche (m}^2\text{)} \\ r & = \text{Radius (m)} \end{array} \quad (2.1)$$

Damit die Schwerkraft das Gel nicht über den Deckglasrand hinaus befördert, wurden die Objektträger zum Aushärten der Gele mit dem Deckglas nach unten bei 4 °C für 12 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die Überkopflagerung bewirkte zudem, dass die Fluoreszenzpartikel an die Oberfläche des Gels sanken und dadurch am Mikroskop fokussiert werden konnten.

Nach Aushärtung der Gele wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger mit Gel zweimalig für 15 Minuten in 50 mM HEPES Pufferlösung pH 8,5 bei Raumtemperatur gewaschen.

Tabelle 5: Materialien für die Polyacrylamidgele

<b>Acrylamid</b> $C_3H_5NO$	Carl Roth, Nr. 3037.1
<b>BIS-Acrylamid (N,N'-Methylen-bis-Acrylamid)</b> $C_7H_{10}N_2O_2$	Sigma, Nr. M7279
<b>Latexpartikel</b> Fluosphere Carboxylate-modified 2 % Solids; Exzitation/ Emission: 505 nm/ 515 nm (gelb-grün)	Molecular Probes Nr. F-8811 (Ø 0,2 µm) Nr. F-8813 (Ø 0,5 µm)
<b>10 % Ammoniumpersulfat (APS)</b> 0,1 g Ammoniumpersulfat $(NH_4)_2S_2O_8$ + 1 ml ddH <sub>2</sub> O	Serva, Nr. 13375
<b>TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)</b> $C_6H_{16}N$	Carl Roth, Nr. 23673

### 2.1.3 Kollagenbeschichtung der Gele

Das Polyacrylamidgel bietet für Zellen keine ausreichende Haftunterlage, weshalb dieses mit Kollagen Typ I beschichtet wurde. Sulfo-SANPAH bildet ein Bindeglied zwischen der Geloberfläche und dem Kollagen. Nach Beschichten des Gels mit 200 µl Sulfo-SANPAH-Lösung wurde dieses durch Bestrahlung für 10 Minuten unter einer UV-Lampe (60 W Leistung) aktiviert. Nach Wiederholung des Vorganges wurden die Gele mit HEPES

gespült und mit 0,1 %iger Kollagenlösung bedeckt. Eine Bindung des Kollagens an Sulfo-SANPAH erfolgte durch Inkubation für 6 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank.

Überschüssiges Kollagen wurde durch Waschen mit PBS (drei mal 5 Minuten) entfernt. Um keimfreie Gele zu gewährleisten, wurden diese unter der Sterilwerkbank mit sterilem PBS bedeckt und für eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt.

Tabelle 6: Materialien für die Kollagenbeschichtung

<b>Kollagenlösung</b> Kollagen Typ I (Kalbhaut), 0,1 % Lösung in 0,1 M Essigsäure	Sigma, Nr. C8919
<b>Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-phenylamino)hexanoate)</b>	Thermo Scientific, Nr. 22589

### 2.1.4 Messung des Elastizitätsmoduls der Gele

Der Elastizitätsmodul ist eine Stoffkonstante, die eine Aussage über die Verformbarkeit in bestimmten Kraftbereichen zulässt. Demnach sind Materialien elastisch, wenn sie nach einer Krafteinwirkung wieder in ihre ursprüngliche Form zurückkehren. Die lineare Elastizität beschreibt darüber hinaus einen proportionalen Zusammenhang zwischen angewandeter Kraft und resultierender Deformierung. Polyacrylamidgele verhalten sich linear elastisch in den von Osteoblasten aufgetragenen Kraftbereichen. Werden zu große Kräfte auf das Gel ausgeübt, kommt es zu einer permanenten Deformierung. Aufgrund dieser Geleigenschaften kann der Elastizitätsmodul gemäß dem Hookeschen Gesetz (Gross et al., 2011) beschrieben werden (siehe Formel 2). Dabei kommt es bei einer definierten Kraft



pro Fläche (Spannung) zu einer proportionalen Längenänderung des Materials (Dehnung).

$$E = \frac{F \cdot l_0}{A \cdot \Delta l} \quad \begin{array}{ll} E & = \text{Elastizitätsmodul (N/m}^2\text{)} \\ F & = \text{Kraft (N)} \\ A & = \text{Fläche (m}^2\text{)} \\ l_0 & = \text{Ausgangslänge (m)} \\ \Delta l & = \text{Längenänderung (m)} \end{array} \quad (2.2)$$

Diese Stoffkonstante ist jedoch von der Konzentration des verwendeten Acrylamids und BIS-Acrylamids abhängig und musste für jede Gelcharge neu bestimmt werden. Der Elastizitätsmodul verhält sich annäherungsweise proportional zu der verwendeten Konzentration an BIS-Acrylamid (siehe Abbildung 3).

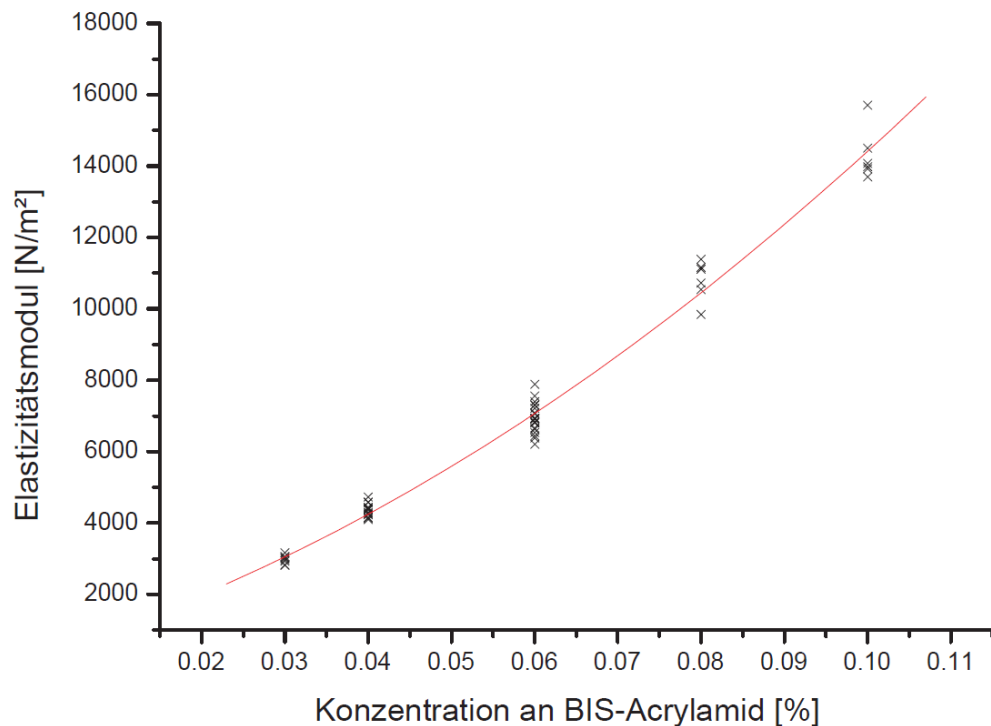


Abbildung 3: Annähernd lineare Abhängigkeit des Elastizitätsmoduls von der BIS-Acrylamidkonzentration (Curtze et al., 2004)

Den Elastizitätsmodul des Gels nach der Hookeschen Gleichung experimentell zu quantifizieren, ist aufgrund der geringen Längenänderungen nicht praktikabel (Dembo et al., 1999). Besser kann dieses nach Radmacher et al. mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) bestimmt werden (Radmacher et al., 1992). Eine detaillierte Beschreibung des AFM erfolgte durch Struckmeier (Struckmeier et al., 2001). Am Rasterkraftmikroskop ist als zentrales Bauteil eine Kugel auf einem Hebelarm (Cantilever) mit definierter Federkonstante befestigt. Der Cantilever reflektiert einen Laserstrahl, der wiederum von einem positionsempfindlichen Detektor (PSD) registriert wird. Bewegt wird der Hebelarm durch ein Piezoelement. Kommt es beim Kontakt der Kugel mit der Probenoberfläche zum Auslenken des Hebelarms, wird der Laserstrahl ebenfalls abgelenkt und trifft auf eine andere Position am PSD (siehe Abbildung 4). Bei bekannter Federkonstante des Cantilevers und bekanntem Vorschub durch das Piezoelement kann die Positionsdivergenz am PSD in die aufgebrachte Kraft und die Eindringtiefe in die Probe umgerechnet werden.

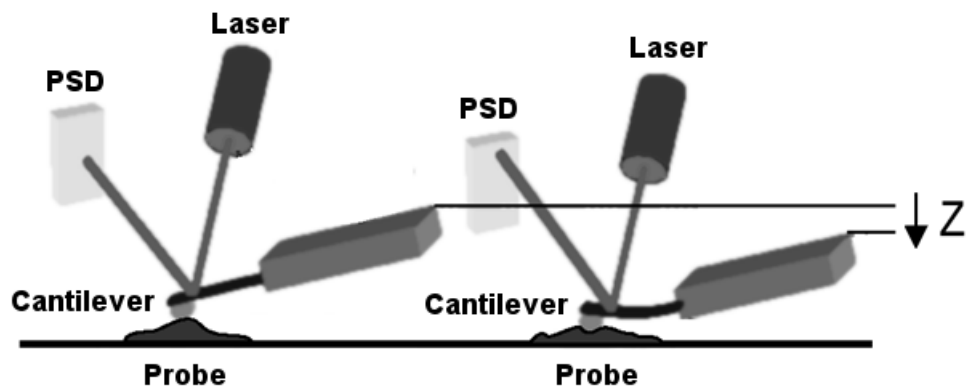


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops. Gezeigt wird rechts der Vorschub durch das Piezoelement (Z) mit Ablenkung des Laserstrahls auf dem Cantilever und dem positionsempfindlichen Detektor (PSD) bedingt durch die Steifigkeit der Probenoberfläche (nach Mennenga-Klopp, 2006).

Für die Berechnung des Elastizitätsmoduls (siehe Formel 4) wird die Poissonzahl benötigt, die das Verhältnis von Längen- zu Dickenänderung eines Materials bei Krafteinwirkung beschreibt:

$$\mu = - \frac{\Delta d / d}{\Delta l / l} \quad \begin{array}{ll} \mu & = \text{Poissonzahl} \\ d & = \text{Dicke (m)} \\ l & = \text{Länge (m)} \end{array} \quad (2.3)$$

Nach Li et al. besitzen Polyacrylamidgele eine Poissonzahl von 0,3 (Li et al., 1993). Damit ergibt sich für den Elastizitätsmodul folgende Berechnung:

$$E = \frac{3(1 - \mu^2)F}{4\sqrt{d^3 r}} \quad \begin{array}{ll} E & = \text{Elastizitätsmodul (N/m}^2\text{)} \\ \mu & = \text{Poissonzahl} \\ F & = \text{Kraft (N)} \\ d & = \text{Eindringtiefe (m)} \\ r & = \text{Radius der Kugel (m)} \end{array} \quad (2.4)$$

### 2.2 Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen orientierte sich an der von Lindl et al. und Spector et al. beschriebenen Methodik (Lindl et al., 1994; Spector et al., 1998). Für die Experimente wurden primäre bovine Osteoblasten verwendet. Als Medium für die Kultivierung diente Ham's F10 Medium mit Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS). Das verwendete FCS der Firma Seromed gewährleistet eine gleichbleibende biologische Eigenschaft. Ein wiederholtes Austesten des FCS entfällt. Die Kultivierung erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit.

### 2.2.1 Gewinnung primärer boviner Osteoblasten

Die Osteoblasten wurden vom Os metacarpale nach dem Auswachsverfahren gewonnen (Jones et al., 1991). Die distale vordere Extremität eines frisch geschlachteten Jungbullens wurde von einem lokalen Schlachthof bezogen. Die Reinigung erfolgte mit Wasser und Alkohol. Anschließend wurde unter der Sterilwerkbank die Weichteildeckung mit einem Skalpell bis auf das Periost abpräpariert. Nach Spülen mit PBS wurde die Knochenhaut in 5 mm breiten Streifen vom Knochen gelöst. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten in 37 °C warmer Earle's Salzlösung folgte ein 20-minütiger Waschvorgang in Earle's Salzlösung mit Antibiotikazusatz. Anschließend wurden die Perioststreifen in 5 x 5 mm große Quadrate zerteilt und jeweils 10 Quadrate gleichmäßig in Zellkulturschalen (Ø 14 cm) mit der dem Knochen anliegenden Seite ausgelegt und mit BGJb Medium eingedeckt. Ein Mediumwechsel erfolgte erstmalig nach 24 Stunden, dann wöchentlich. Der nach 4 Wochen konfluent gewachsene Zellrasen wurde abgelöst und die Zellen kryokonserviert oder für die Versuche verwendet.

### 2.2.2 Ablösen der Zellen, Zellzählung und Passagieren

Zum Ablösen der konfluent gewachsenen Osteoblasten wurde das Medium abgesaugt und nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 2 ml 37 °C warmer Trypsin-EDTA-Lösung. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde der Ablösevorgang kontrolliert. Die Enzymreaktion von Trypsin wurde durch Zugabe der dreifachen Menge an Ham's F10 Medium gestoppt. Die Suspension wurde mit Ham's F10 Medium auf 20 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das nach dem Absaugen vom Medium übrig gebliebene Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert.

Um eine gleichmäßige Zelldichte zu gewährleisten, wurde die Anzahl der Zellen mit dem Zellzählautomaten CASY bestimmt. Hierzu wurden 50 µl

der Zellsuspension mit 10 ml isotonischer Salzlösung verdünnt und die Anzahl der Zellen pro Milliliter bestimmt.

Das Zellsuspendat wurde für die Passage in neue Zellkulturflaschen 1:5 mit Medium verdünnt, kryokonserviert oder für die Versuche verwendet.

Tabelle 7: Materialien für das Ablösen der Zellen

<b>Trypsin-EDTA-Lösung</b>	
100 ml Trypsinlösung 10x	Sigma, Nr. T4174
+ 900 ml PBS	

### 2.2.3 Kryokonservierung

Durch die Tiefkühlagerung kann auf Zellen gleichen Alters für die Versuche zurückzugriffen werden. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale durch Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und die Zellzahl in der Suspension bestimmt. Die Suspension wurde mit Medium auf zwei Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt und im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium versetzt. Nach Überführung in Kryoröhrchen erfolgte eine Vorkühlung in einer Styroporbox im Gefrierschrank für 12 Stunden bei -80 °C, um Kälteschäden durch zu schnelles Abkühlen zu vermeiden. Anschließend konnten die Zellen in die Stickstofftanks überführt und bei -196 °C gelagert werden.

Um die tiefgekühlten Zellen für die Versuche verwenden zu können, wurden diese im Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in vorgewärmtes Ham's F10 Medium überführt und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen aufgeteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

Tabelle 8: Materialien für die Kryokonservierung

<b>Einfriermedium</b>	
Ham's F10	
+ 20% v/v Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Nr. 154938
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	

### 2.2.4 Aussäen der Zellen

Das Aussäen erfolgte auf dem Gel der Objektträger in einer Einzelschicht mit einer Dichte von 3500 Zellen/cm<sup>2</sup>. Die mit Zellen bestückten Gele wurden bis zur Verwendung 24 bis 72 Stunden im Brutschrank belassen.

### 2.2.5 Phänotypisierung der Osteoblasten

Um die durch die Auswachsmethode gewonnen Zellen als Osteoblasten zu typisieren, wurde eine Phänotypisierung anhand zellspezifischer Proteine durchgeführt. Das von Osteoblasten synthetisierte Osteocalcin, bone sialoprotein (BSP) und Kollagen I wurden immunzytochemisch durch die labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB) nachgewiesen.

Bei dieser Methode wurden Zellen auf Deckgläsern für zwei Tage in Medium kultiviert und nach Waschen mit PBS mit einem 1:1 Aceton-Methanol-Gemisch für 10 Minuten bei -20 °C fixiert.

Anschließend und zwischen jedem weiteren Arbeitsschritt wurde mit PBS gewaschen. Um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurde 0,3 % Wasserstoffperoxid für 10 Minuten zugegeben. Danach wurden die Zellen nacheinander jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären spezifischen Antikörper, dem sekundären biotinkonjugierten Antikörper und dem peroxidasekonjugierten Streptavidin inkubiert. Im Anschluss wurde mit Chlornaphtol als Farbstoff und Wasserstoffperoxid als Substrat für zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Stoppen der Färbereaktion mit Wasser wurden die Proben luftgetrocknet und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Für die Positivkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers ein Anti-Vimentin-Antikörper verwendet und für die Negativkontrolle Mausserum.

Tabelle 9: Antikörper für die Phänotypisierung

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Vimentin (mouse), Boehringer (814318, Clone V9)	1:4
anti-Osteocalcin (mouse), Larry Fisher (NIH)	1:50
anti-Pro-Collagen I (rabbit), Larry Fisher (LF41)	1:30
anti-BSP (rabbit), Larry Fisher (LF6)	1:100
<b>Biotinkonjugierte Antikörper</b>	
anti-mouse, Boehringer (1089285)	1:50
anti-rabbit, Boehringer (1214659)	1:50
<b>Peroxidasekonjugiertes Streptavidin</b>	
Streptavidin, Boehringer (1089153)	1:30

### 2.3 Zugkraftmikroskopie

Um den Betrag, die Richtung und den Ursprung der Kraft in Osteoblasten zu untersuchen, wurde die Methode der Zugkraftmikroskopie verwendet. Eine detaillierte Beschreibung erfolgte durch Marganski et al. (Marganski et al., 2003).

Die elastischen Eigenschaften des Gels sind für die nachfolgenden Annahmen und Berechnungen von zentraler Bedeutung. Wird eine Kraft durch eine auf dem Gel liegende Zelle generiert, führt dies zu einer Deformierung des Gels im Sinne einer Längenänderung. Diese geht mit einer

Verschiebung der im Gel eingebrachten Fluoreszenzpartikel einher. Wird die Distanz zwischen den Fluoreszenzpartikeln vor und während der Deformierung gemessen, kann bei bekannten Geleigenschaften die aufgewendete Kraft berechnet werden.

Für die Berechnungen wurde das Libtrc-Softwarepaket (M. Dembo, Department of Biomedical Engineering, Boston University) verwendet. Um Verschiebungen von Fluoreszenzpartikeln darzustellen, wurden die Fluoreszenzbilder des Versuchs mit einem Fluoreszenzbild ohne Zelle (Referenzbild) verglichen. Hierzu wurde nach dem Versuch Trypsin in die Kammer gespült, um die Zelle abzulösen. Anschließend konnte das Referenzbild aufgenommen werden. Da ein einzelnes Fluoreszenzpartikel aufgrund der gleichen Größe von  $0,2\ \mu\text{m}$  bzw.  $0,5\ \mu\text{m}$  im Bild nicht wiedergefunden werden kann, muss eine sogenannte Korrelationsbox definiert werden. Diese besteht aus einem rechteckigen Areal, in dem ein einzigartiges Muster von Fluoreszenzpartikeln (Intensitätsmuster) liegt. Mit dieser Korrelationsbox lassen sich innerhalb einer vorgegebenen rechteckigen Fläche (Suchbox) die Verschiebungen nachvollziehen (siehe Abbildung 5).

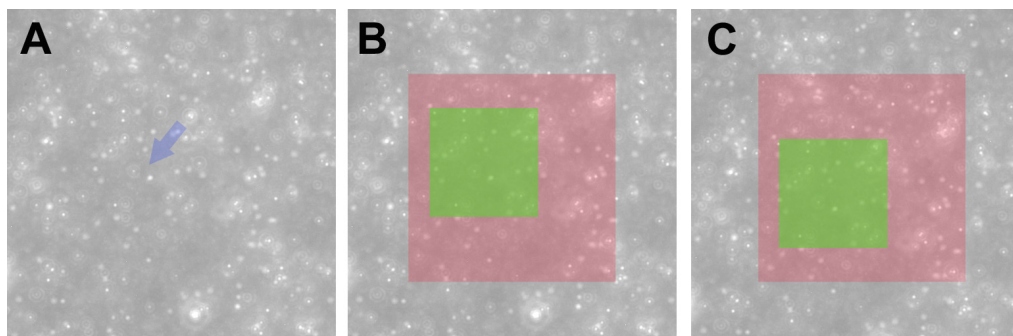


Abbildung 5: Verschiebung der Intensitätsmuster. **A** Durch Pfeil gekennzeichnete erwartete Deformierung des Gels mit Verschiebung der Intensitätsmuster **B** Korrelationsbox (grün) und Suchbox (rot) am nicht deformierten Gel **C** Verschiebung der Korrelationsbox mit Intensitätsmuster innerhalb der Suchbox



Bei bekanntem Elastizitätsmodul des Gels und bekannter Bildauflösung kann die Kraft an einem Ursprungsort mit Betrag und Richtung berechnet werden. Da nur Kräfte mit Ursprung innerhalb der Zellgrenzen berücksichtigt wurden, mussten die Zellgrenzen definiert werden. Hierzu wurden am Phasenkontrastbild die Pixelkoordinaten des Zellularisses mit dem Zeichenprogramm GIMP (GNU Image Manipulation Program) ermittelt.

### 2.3.1 Berechnung der Deformationsmatrix

Die Deformationsmatrix zeigt alle berechneten Kräfte im Bildausschnitt unabhängig von den Zellgrenzen. Die Darstellung erfolgt durch Kraftvektoren. Die durch die Zelle hervorgerufene Deformierung des Gels wird mit dem optischen Fluss-Ansatz zur Analyse bewegter Bilder quantifiziert (Marganski et al., 2003). Hiermit werden Verschiebungen eines eindeutigen Intensitätsmusters der Fluoreszenzpartikel im Gel gesucht. Dies geschieht anhand eines Vergleichs zwischen einem Bild mit Zelle und einem Referenzbild ohne Zelle und ohne Krafteinwirkung. Die Intensitätsmuster werden durch einen festgelegten Bereich der Korrelationsbox definiert. Weiterhin wird die Größe der Umgebung, in der nach dem verschobenen Intensitätsmuster gesucht werden soll, über die Suchbox bestimmt. Die Übereinstimmung der Intensitätsmuster wird über die Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $R$  bestimmt (Marganski et al., 2003). Die Werte von  $R$  liegen zwischen -1 und +1, wobei +1 die größte Übereinstimmung bedeutet und somit identische Intensitätsmuster der Korrelationsbox vorliegen. Im Verlauf der Suche nach dem Höchstwert für  $R$  wird die Korrelationsbox als Zentrum der Suchbox gewählt und der Korrelationskoeffizient in der Umgebung erneut berechnet. Bleibt die Korrelation auf dem zuvor ermittelten Maximum, ist die Verschiebung bekannt. Um den Ursprung der Kraft zu definieren, werden Knotenpunkte eines Gitternetzes festgelegt. Äquivalent zu den Intensitätsmustern werden die Verschiebungen der Knotenpunkte berechnet. Als Ergebnis der Berechnungen resultiert die

Deformationsmatrix mit den Kraftvektoren und ihren Ursprungsknoten (siehe Abbildung 6).

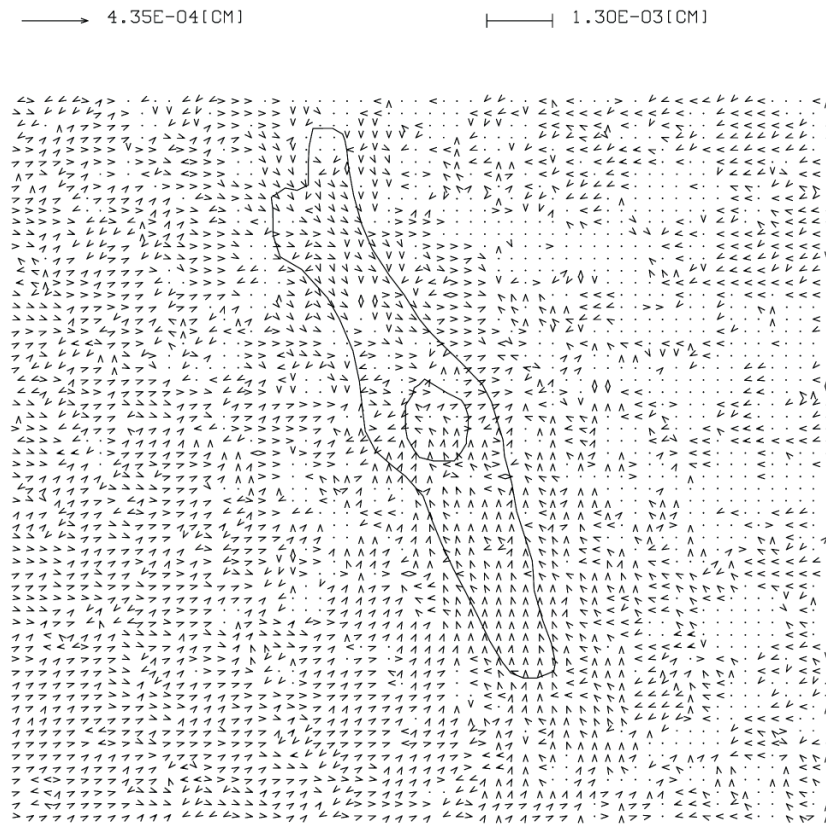


Abbildung 6: Deformationsmatrix mit Kraftvektoren und ihren Ursprungsknoten. In der Mitte dargestellt der Zellumriss. Kraftvektor- und Maßstabs-Eichmarken am oberen Bildrand

Wird eine starke Verformung in der Umgebung eines nicht stark verformten Areal berechnet, werden diese Vektoren als suspekt eingestuft und erneut berechnet. Die theoretische Genauigkeit dieser Methode liegt bei 0,1 Pixel (Marganski et al., 2003).

Bei dieser Methode liegen häufige Fehlerquellen in der Qualität des Fluoreszenzbildes, sodass die Intensitätsmuster nicht wiedergefunden werden und zwangsläufig eine falsche Berechnung erfolgt. Der Verlust der

Fokusebene während des Experiments durch Erschütterungen am Mikroskopisch, schlecht ausgeleuchtete Bilder oder das Herauswaschen von Fluoreszenzpartikeln sind Beispiele. Durch Serienaufnahmen des Referenzbildes mit  $5\text{ }\mu\text{m}$  Abständen in der Fokusebene kann dennoch eine Berechnung der Deformationsmatrix anhand mehrerer Bilder erfolgen. Das Bild mit der besten Übereinstimmung wird für die weiteren Berechnungen verwendet.

### **2.3.2 Ursprungsknoten der Kraftvektoren innerhalb der Zelle**

Um die Kraftvektoren berechnen zu können, ist es notwendig, den Ansatzpunkt der Kraft zu definieren. Dies geschieht durch Erstellen eines Gitternetzes in Form des Zellumrisses, bei dem die Knotenpunkte als Ursprung für die Kraftvektoren dienen. Ein die Zellgrenzen überragendes rechteckiges Gitternetz wird so lange geteilt, bis eine vordefinierte Anzahl an Ursprungsknoten erreicht ist (je nach Zellgröße bis zu 2500 Knotenpunkte). Außerhalb des Zellumrisses gelegene Rechtecke werden entfernt und solche, die die Zellumrisse schneiden, der Zellkontur angepasst.

### **2.3.3 Berechnung der Kraftvektoren**

Die zuvor berechnete Deformationsmatrix liefert die Grundlage für die Kraftvektorberechnung. Durch Bestimmung zweidimensionaler Vektoren im Raum auf elastischen Substraten (Landau et al., 1986) kann eine Aussage zur Richtung und Größe der Kraftvektoren innerhalb der Zelle getroffen werden. Hierbei handelt es sich um Projektionen des dreidimensionalen Vektors auf eine Ebene.

### **2.3.4 Visualisierung der Kraftvektoren**

Zur besseren Darstellung werden nur solche Vektoren durch einen Pfeil dargestellt, die mindestens einem Pixel entsprechen. Jedoch werden auch

die nicht dargestellten Vektoren in die Kraftberechnung einbezogen. Die Eichmarken der Kraftvektoren werden in  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  angegeben. Die Angabe einer Spannung macht insofern Sinn, als dass hier die berechnete Kraft auch in der Umgebung des Knotenpunktes wirkt, also auf eine Fläche. Die über die Gesamtfläche der Zelle wirkende Spannung kann durch Berücksichtigung der Zellfläche in eine Kraft umgerechnet werden. Die Mittelwerte der Kräfte und Flächen wurden für die statistische Auswertung verwendet.

Die Ergebnisse einer exemplarischen Berechnung sind in Abbildung 7 dargestellt. Neben dem Zellumriss mit Zellkern sind das Gitternetz mit den Ursprungsknoten, die Kraftvektoren und eine farbliche Visualisierung (Heatmap) der Kräfte dargestellt. Zu erkennen ist hier eine übliche Kraftverteilung mit den größten Kräften an den Zellausläufern und den kleinsten Kräften im Bereich des zentral gelegenen Zellkernes mit zum Zellinneren gerichteten Kraftvektoren.

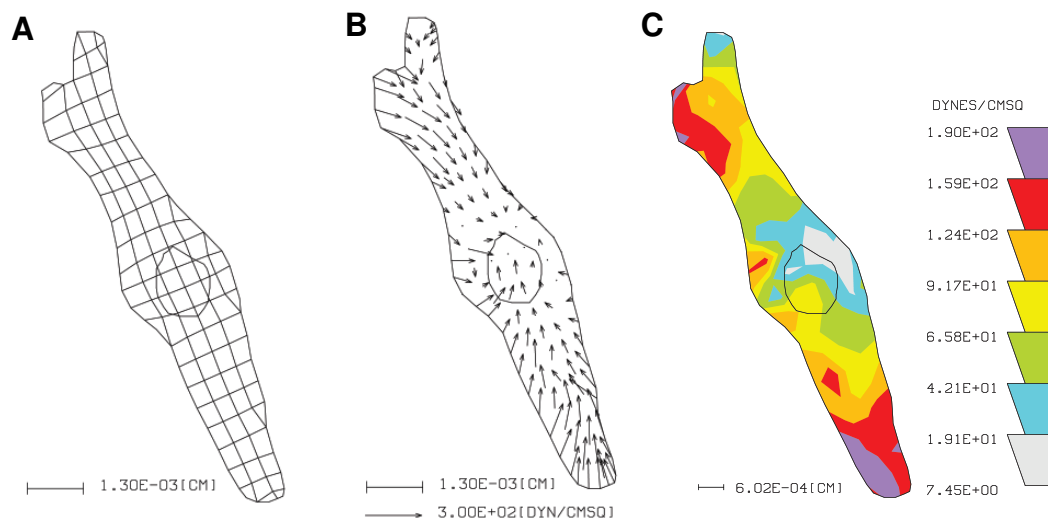


Abbildung 7: Graphische Ausgabe der Libtrc-Software. **A** Ursprungsknoten der Kraftvektoren innerhalb der Zellgrenzen **B** Kraftvektoren innerhalb der Zellgrenzen **C** Farbliche Darstellung (Heatmap) der Kraft innerhalb der Zellgrenzen. Jeweils mit Längen- und Kraftvektor-Eichmarken

### 2.4 Grundzüge der Strömungslehre

Eine detaillierte Beschreibung erfolgte durch Schlichting et al. (Schlichting et al., 1967).

Für die Berechnung der Scherspannung, die auf die Zelloberfläche wirkt, werden die physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeit und die Abmessungen der Flusskammer benötigt. Ferner müssen Rahmenbedingungen für die strömende Flüssigkeit erfüllt sein, um die Berechnungen durchführen zu können.

Bei Wasser handelt es sich im Sinne der Strömungslehre um ein inkompressibles Fluid mit reibungsbehafteter Strömung. Wichtige Kenndaten für Wasser bei konstantem Druck und Zimmertemperatur ( $\vartheta = 20\text{ °C}$ ) sind die Dichte ( $\delta = 997,3\text{ kg/m}^3$ ) und die dynamische Viskosität ( $\eta = 1010\text{ }\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) (Schlichting et al., 1967).

Bei der Bauform der Kammer sind nach Bakker et al. die Länge, Breite, Höhe sowie der Ein- und Ausflussbereich für die Ausbildung des Strömungsprofils von Bedeutung (Bakker et al., 2003).

#### 2.4.1 Berechnung der Scherspannung

Die Scherspannung ist definiert als eine parallel zu einer Oberfläche wirkende Kraft und wird in der Dimension Kraft pro Fläche (Pa oder  $\text{N/m}^2$ ) angegeben. Die veraltete Einheit Dyne ist durch die SI-Einheit Newton ersetzt worden, wobei  $1\text{ dyn/cm}^2$   $0,1\text{ N/m}^2$  entspricht. Aufgrund der Verwendung in der aktuellen Literatur wird auch in der vorliegenden Arbeit die Scherspannung in  $\text{dyn/cm}^2$  angegeben.

$$\tau = \frac{F}{A} \qquad \begin{array}{ll} \tau &= \text{Scherspannung (Pa)} \\ F &= \text{Kraft (N)} \\ A &= \text{Fläche (m}^2\text{)} \end{array} \qquad (2.5)$$

Für die Berechnung der Scherspannung muss berücksichtigt werden, dass eine reibungsbehaftete Strömung vorliegt. Zwischen allen Flüssigkeitsschichten einer strömenden Flüssigkeit wirkt nicht nur eine Gewichtskraft, sondern auch eine Reibungskraft, die der Fließgeschwindigkeit entgegenwirkt. Zwischen zwei parallel angeordneten Platten, bei denen die obere Platte auf der Flüssigkeit frei schwimmt, ergibt sich eine lineare Verteilung der Geschwindigkeit (siehe Abbildung 8). An beiden Platten haftet die Flüssigkeit durch die Reibung und führt an der feststehenden Platte an der benetzten Oberfläche zum Stillstand der Flüssigkeit. Die schwimmende Platte wird mit der maximalen Fließgeschwindigkeit bewegt.

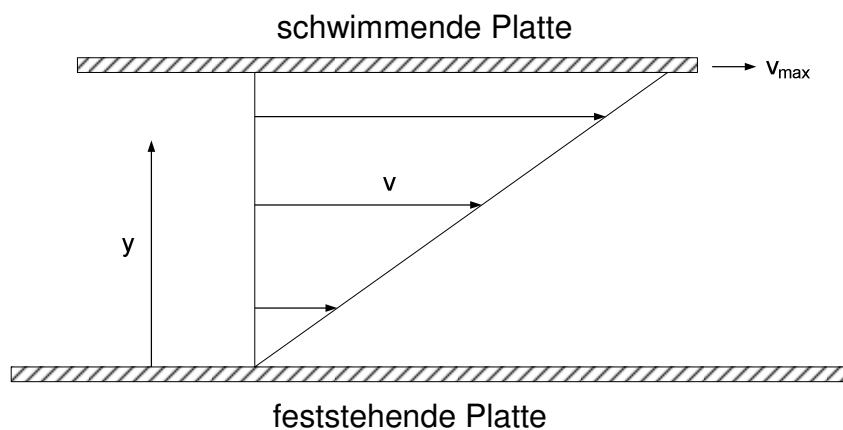


Abbildung 8: Geschwindigkeitsprofil zwischen einer feststehenden und einer schwimmenden Platte. Die Geschwindigkeit  $v$  nimmt linear zwischen den Platten über die Höhe  $y$  zu bis  $v_{max}$  als maximale Fließgeschwindigkeit erreicht wird (nach Schlichting et al., 1967).

In der Parallelflosskammer entwickelt sich das Strömungsprofil zwischen zwei feststehenden Platten. Die Flüssigkeit kann in endlich dünne Schichten untergliedert werden. Zwischen der strömenden Flüssigkeit und der feststehenden Platte bildet sich eine Grenzschicht, in der die Reibung zu einem Stillstand der Flüssigkeit führt (Prandtl, 1904). In der Mitte besteht ein Geschwindigkeitsmaximum. Durch Integration der Geschwindigkeit über die Kanalhöhe ergibt sich für das Strömungsprofil im zweidimensionalen Fall eine parabolische Form (siehe Abbildung 9). In den Kammer-

ecken sowie in den Ein- und Austrittsbereichen kommt es zu Randeffekten mit Verwirbelungen und einem nicht voll ausgebildeten Strömungsprofil (Bakker et al., 2003).

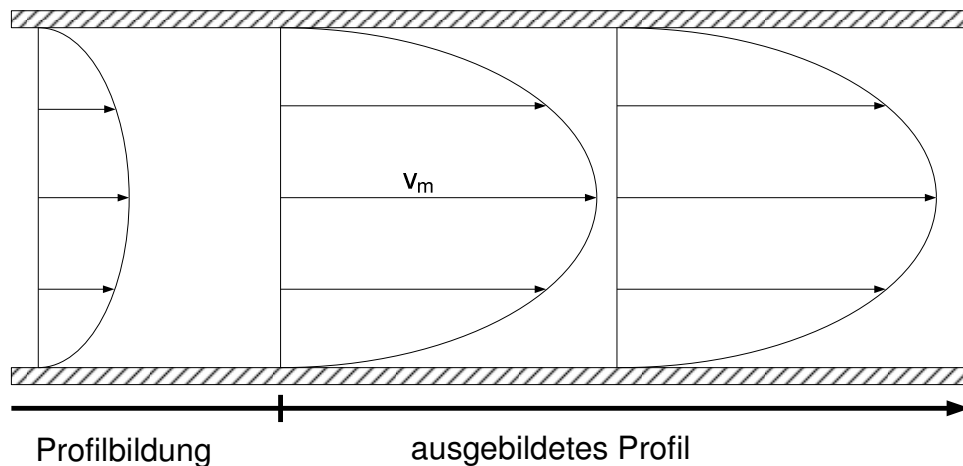


Abbildung 9: Geschwindigkeitsprofil zwischen zwei feststehenden Platten. Schematische Darstellung der Profilbildung.  $v_m$  ist die maximale Geschwindigkeit in der Profilmitte (nach Busscher et al., 2006).

Bei Strömungen mit Reibung ist die Scherspannung eine Funktion der Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Kanalhöhe. Einerseits nähert sich die Scherspannung einem Maximum, wenn der Abstand zur Wand gegen Null geht. Andererseits wird die Scherspannung gegen Null streben, wenn der Abstand zur angeströmten Oberfläche zunimmt.

$$\tau = \frac{dv}{dy}$$

$\tau$	=	Scherspannung (Pa)	(2.6)
$v$	=	Fließgeschwindigkeit (m/s)	
$y$	=	Abstand zur Wand (m)	

Um diese allgemein gültige Gleichung zu lösen, müssen weitere Rahmenbedingungen festgelegt werden. Die Annahme eines Hele-Shaw-Flusses ist hierfür notwendig. Dabei handelt es sich um eine zweidimensionale Strömung, die in einem Kanal fließt, der eine sehr kleine Kanalhöhe im

Vergleich zur Kanallänge aufweist ( $h \ll l$ ). Damit erhält man durch Lösen der Navier-Stokes-Gleichungen die für rechteckige Profile gültige Formel (Usami et al., 1993):

$$\tau = \eta \frac{6Q}{h^2 \cdot w} \quad (2.7)$$

$\tau$	=	Scherspannung (Pa)
$\eta$	=	dynamische Viskosität (Pa·s)
$Q$	=	Massendurchsatz (m <sup>3</sup> /s)
$h$	=	Kanalhöhe (m)
$w$	=	Kanalbreite (m)

### 2.4.2 Ausbildung einer laminaren Strömung

Für die Berechnung der Scherspannung nach Formel 7 ist die Ausbildung einer laminaren Strömung Voraussetzung. Eine laminare Strömung liegt vor, wenn es zu keinem Austausch von Flüssigkeitspartikeln zwischen den Schichten kommt (Rotta, 1972; Schlichting et al., 2006). Falls diese Bedingung nicht zutrifft, nennt man die Strömung turbulent.

Um abschätzen zu können, ob eine Strömung laminar oder turbulent verläuft, wird die Reynolds-Zahl berechnet. Sie ist eine dimensionslose Zahl, die von der Viskosität und der Fließgeschwindigkeit des Mediums sowie von der Länge der angeströmten Oberfläche abhängt. Bereits 1883 konnte Osborne Reynolds mittels eines Farbfadens diese physikalischen Zusammenhänge in Rohrströmungen nachweisen (Schlichting et al., 1967).

$$\text{Re} = \frac{v \cdot \delta \cdot l}{\eta} \quad (2.8)$$

Re	=	Reynolds-Zahl
$v$	=	Geschwindigkeit (m/s)
$\delta$	=	Dichte (kg/m <sup>3</sup> )
$l$	=	Länge (m)
$\eta$	=	dynamische Viskosität (Pa·s)

Da die Reynolds-Zahl von der Bauform abhängig ist, muss sie für ein rechteckiges Profil unter Berücksichtigung des hydraulischen Durchmes-



sers berechnet werden (Bakker et al., 2003). Dieser ist eine Näherung an kreisrunde Querschnitte für Berechnungen in der Strömungslehre (Schlichting et al., 1967).

$$\text{Re} = \frac{\delta \cdot Q}{(h + w) \cdot \eta} \quad \begin{array}{ll} \text{Re} &= \text{Reynolds-Zahl} \\ Q &= \text{Massendurchsatz (m}^3/\text{s)} \\ \delta &= \text{Dichte (kg/m}^3\text{)} \\ h &= \text{Kanalhöhe (m)} \\ w &= \text{Kanalbreite (m)} \\ \eta &= \text{dynamische Viskosität (Pa}\cdot\text{s)} \end{array} \quad (2.9)$$

Bei den Versuchen lagen Reynolds-Zahlen von  $\text{Re} \approx 10$  vor. Dies ist deutlich kleiner als die kritische Reynolds-Zahl  $\text{Re}_{\text{krit}} \cong 2300$ , bei der eine laminare Strömung in eine turbulente Strömung übergeht (Wibel, 2008) und die Scherkraftberechnung mit der beschriebenen Methode nicht durchgeführt werden dürfte.

Ob sich ein Strömungsprofil frei ausbildet, kann durch die Profilentwicklungslänge bestimmt werden (siehe Formel 10). Diese wird durch die Kammerhöhe, die Reynolds-Zahl und eine Konstante bestimmt, die von der Bauform abhängig ist und von Busscher et al. für Parallelfusskammern zwischen 0,013 und 0,044 angegeben wird (Busscher et al., 2006).

$$L_e = c \cdot \text{Re} \cdot h \quad \begin{array}{ll} L_e &= \text{Profil-Entwicklungslänge (m)} \\ \text{Re} &= \text{Reynolds-Zahl} \\ h &= \text{Kanalhöhe (m)} \\ c &= \text{Konstante} \end{array} \quad (2.10)$$

Wird die größte anzunehmende Konstante für die Berechnung der Profilentwicklungslänge zugrunde gelegt, ergibt sich für diesen Versuchsaufbau ein Wert von  $L_e \approx 60 \mu\text{m}$ . Ein voll ausgebildetes Strömungsprofil in der Mitte des 16 mm durchmessenden Gels ist damit gewährleistet.

### 2.5 Versuchsaufbau

Für die Scherkraftversuche wurde als Versorgungsmedium Ham's F10 Medium mit 10 mM HEPES Pufferlösung verwendet. Dies war nötig um die Pufferkapazität des Mediums zu erhöhen, da die Versuche bei Raumtemperatur und ohne CO<sub>2</sub>-Begasung stattfanden. Dem Medium der Versuchsgruppe wurde zusätzlich 1 µM ML-7 zugefügt.

Tabelle 10: Materialien für die Versuchsgruppe

#### 11 mM ML-7 Stammlösung

5 mg ML-7 (1-[5-iodonaphthalen-1-sulfonyl]-  
1H-hexahydro-1,4-diazepin hydrochlorid)  
 $C_{15}H_{17}IN_2O_2S \cdot HCl$   
+ 1 ml DMSO

Sigma, Nr. I2764-5MG

#### 2.5.1 Mikroskop und Lichtquellen

Für die Versuche wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop von Nikon (TE-2000 U) verwendet. Die Phasenkontrastaufnahmen erfolgten mit der vorinstallierten Lichtquelle und einer im Lichtweg eingeschalteten Ringblende. In dieser Konstellation wurden die Zellen für den Versuch eingestellt und für den später benötigten Zellulariss abgelichtet.

Um die Fluoreszenz der im Gel eingegossenen Partikel anzuregen, wurde eine Lichtquelle von Richard Wolf (PDD Combilight 5133) eingesetzt. Die entsprechenden Filter für das Anregungs- und Emissionslicht sowie ein dichroitischer Spiegel für die Strahlentrennung waren im Lichtweg eingebaut. Die Anregung der Fluoreszenzpartikel erfolgte bei 505 nm. Die Emissionswellenlänge der Partikel liegt bei 515 nm (siehe Tabelle 5). Die Optik bestand aus einem Objektiv von Nikon (Plan Fluoreszenz 40x ELWD) mit langem Arbeitsabstand (Arbeitsabstand = 3,7 - 2,7 mm).

### 2.5.2 Kamera

Über den Zeitraum der Versuche wurden drei verschiedene charge-coupled device (CCD)-Kameras verwendet, die sich in der Auflösung und Lichtempfindlichkeit des Photochips unterschieden. Neben der Microlmager MI1400 (Xillix) kamen die CoolView EM1000 (Photonic Science) und die Impactron TI (Photonic Science) zum Einsatz. Alle Kamertypen wurden in den Lichtweg des Mikroskops eingeschaltet. Die Datenübertragung erfolgte an einen Computer mit installierter Steuersoftware Image-Pro Plus (MediaCybernetics). Die Belichtungszeiten lagen für Phasenkontrastaufnahmen bei 10 ms (Impactron TI/ CoolView EM1000) beziehungsweise 30 ms (Microlmager MI1400) sowie für Fluoreszenzaufnahmen bei 300 ms (Impactron TI/ CoolView EM1000) beziehungsweise 2000 ms (Microlmager MI1400).

Tabelle 11: Verwendete CCD-Kameras

<b>Impactron TI</b> 8 Bit CCD (1000 x 1000 Pixel)	Photonic Science
<b>Microlmager MI1400</b> 8 Bit CCD (1306 x 1032 Pixel)	Xillix
<b>CoolView EM1000</b> 12 Bit CCD (1000 x 1000 Pixel)	Photonic Science

### 2.5.3 Parallelfusskammer und Flüssigkeitsreservoir

Der Aufbau der hier verwendeten Kammer mit konstanter Scherspannung über die Kammerlänge ist in Abbildung 10 dargestellt. In den offenen Boden wird der Objektträger eingelegt, auf dem das Gel mit den zu beobachtenden Zellen aufgebracht ist. Auf dem Objektträger wird ein 200 µm ho-

her Abstandshalter platziert. Darüber wird ein durchsichtiger Kunststoffquader mit Dichtungsring eingesetzt. Der Deckel wird mit dem Boden verschraubt um die eingebauten Teile zu fixieren und die Kammer dicht zu verschließen. Die Flüssigkeitszufuhr und -abfuhr erfolgt jeweils durch eine am Kammerende befindliche konische Öffnung. Die Kammer hat eine Innenlänge von 60 mm und eine Innenbreite von 26 mm. Da die Gelhöhe 70  $\mu\text{m}$  beträgt (siehe 2.1.2), ist die Höhe des durchströmten Volumens für die Berechnung der Scherspannung  $200\ \mu\text{m} - 70\ \mu\text{m} = 130\ \mu\text{m}$ .

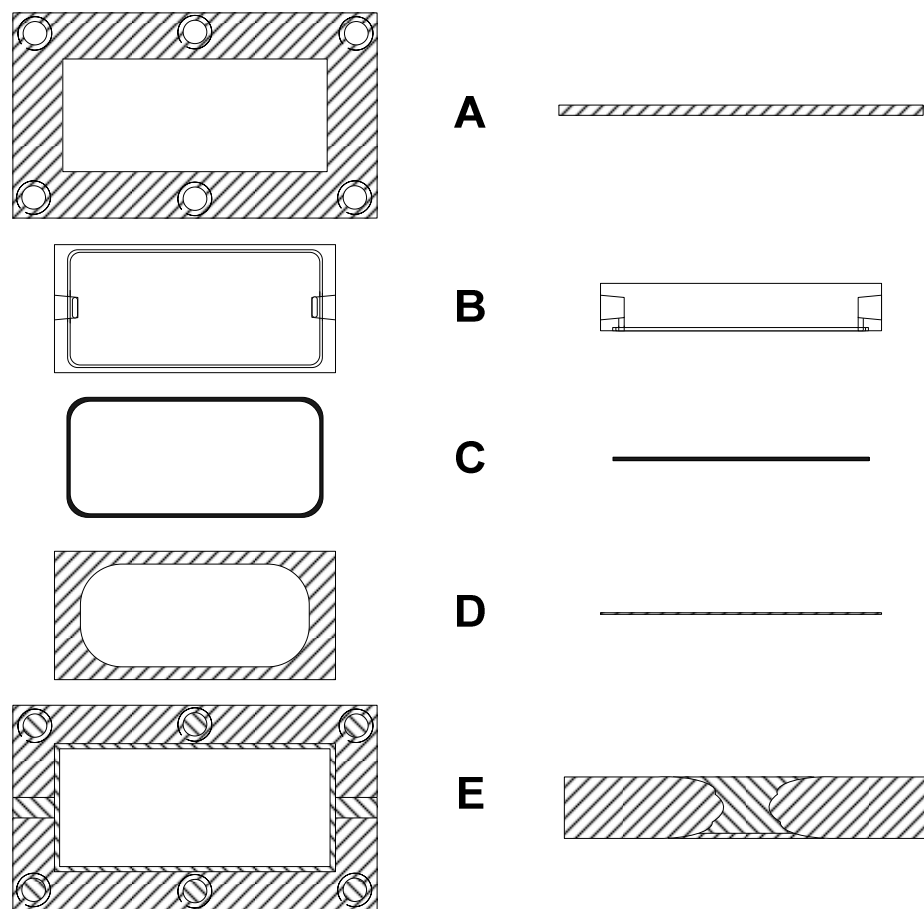


Abbildung 10: Flusskammer. **A** Deckel **B** Kunststoffquader mit konischer Öffnung **C** Dichtungsring **D** Abstandshalter **E** Boden

Eine konstante Flüssigkeitsströmung wurde durch ein Kunststoffreservoir mit gleichbleibendem Druckgradienten erzeugt. Dieses hat in der Mitte einen Zylinder, der als Überlauf dient (siehe Abbildung 11). Da es sich um ein offenes System handelt, bei dem das durch die Kammer fließende Medium verloren geht, wurde durch den vorhandenen Zulauf stetig Flüssigkeit nachgefüllt und damit ein gleichbleibender Flüssigkeitspegel erreicht.

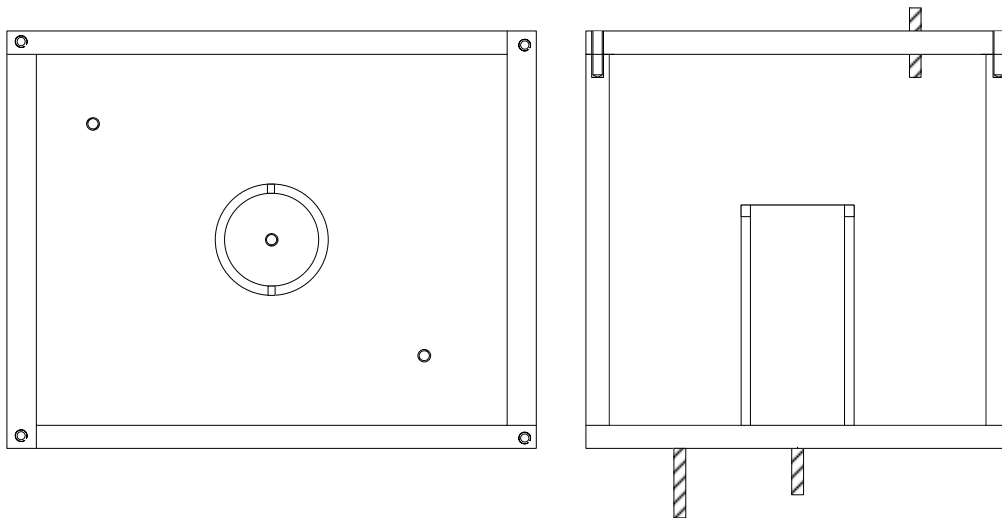


Abbildung 11: Flüssigkeitsreservoir. Zu- und Abläufe sowie mittig der Überlauf.

Zur Berechnung der Scherspannung ist die Kenntnis der Eintrittsgeschwindigkeit in die Flusskammer nötig. Diese ist nach Torricelli zu berechnen (Schlichting et al., 1967) wobei der Flüssigkeitspegel von der Flüssigkeitsoberfläche bis zur Eintrittsöffnung der Flusskammer gemessen wird (siehe Abbildung 12).

$$v = \sqrt{2g \cdot h}$$

$$v = \text{Eintrittsgeschwindigkeit (m/s)} \quad (2.11)$$

$$g = \text{Erdbeschleunigung (m/s}^2\text{)}$$

$$h = \text{Flüssigkeitspegel (m)}$$

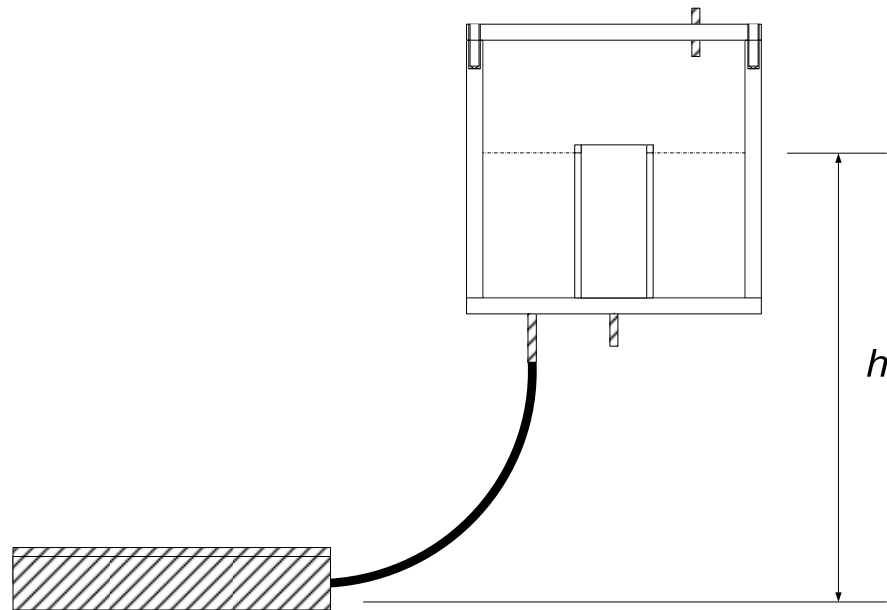


Abbildung 12: Versuchsaufbau. Flüssigkeitsreservoir und Flusskammer mit Flüssigkeitspegel  $h$

### 2.5.4 Durchführung der Versuche

Bei dem verwendeten Versuchsaufbau wurde die Scherspannung über ein hydrostatisches Niveau erzeugt. Luftblasen in der Flüssigkeit führen zu einer Flusstagnation oder zum Ablösen der Zellen während des Versuchs. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde die Kammer in einem mit Medium gefüllten Gefäß vormontiert. Um Randeffekte der Flüssigkeitsströmung (nicht ausgebildetes Strömungsprofil, Verwirbelungen) zu vermeiden, wurden Zellen in der Mitte des Gels beobachtet.

Nach Montage der Flusskammer wurden 10 ml/h Medium durch die Kammer geleitet. Dies entspricht einer Scherspannung von unter 2 dyn/cm<sup>2</sup> (Grundfluss). Der Grundfluss ist nötig um einen Abtransport der Stoffwechselprodukte aus der Parallelflosskammer zu gewährleisten.

Bei der Versuchsgruppe betrug der Inkubationszeitraum im Grundfluss unter Nutzung des mit ML-7 versetzten Mediums 1 Stunde. Die Kontrollgruppe mit dem unbehandelten Medium wurde für 20 Minuten im Grund-

fluss beobachtet. Für die Versuche wurde eine Scherspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  über einen Zeitraum von 5 Minuten generiert (Belastung).

### 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Mittelwerte erfolgte bei nicht normalverteilten Messgrößen durch einen nichtparametrischen Test für unabhängige Stichproben. Hierfür wurde der Ranglistentest nach Mann-Whitney angewendet. Für Korrelationsanalysen wurde der bivariate Korrelationstest nach Kendall-Tau angewendet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Die statistischen Berechnungen und Graphen wurden mit dem Programm SPSS 14.0 erstellt. Bei den Balkendiagrammen wurde ein 95 %-Konfidenzintervall als Fehlerbalken gewählt. Dieses bietet den Vorteil gegenüber der Standardabweichung, die Signifikanz direkt am Diagramm abschätzen zu können.

### 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 38 primäre bovine Osteoblasten als Kontrollgruppe untersucht. Aufgrund einer Zellablösung während des Experiments konnten hiervon 19 Zellen (50,0 %) für die Auswertung verwendet werden. Bei den mit ML-7 inkubierten Osteoblasten als Versuchsgruppe konnten 15 von 29 Zellen (51,7 %) ausgewertet werden. Für die statistische Auswertung wurden vier Gruppen gebildet (siehe Tabelle 12). Die erste Gruppe besteht aus 95 Einzelmessungen in der Kontrollgruppe im Grundfluss (2 dyn/cm<sup>2</sup> Scherspannung). Die zweite Gruppe bilden 380 Messungen in der Kontrollgruppe bei Belastung (30 dyn/cm<sup>2</sup> Scherspannung). Weitere zwei Gruppen wurden äquivalent zu der Kontrollgruppe bei den mit ML-7 inkubierten Osteoblasten erstellt. Im Grundfluss wurden hier 75 Messungen registriert und 300 Messungen bei Belastung.

Tabelle 12: Gruppenbildung der Kontroll- und Versuchsgruppe

Anzahl der Einzelmessungen (N)	Kontrolle	ML-7
Grundfluss	N = 95	N = 75
Belastung	N = 380	N = 300

#### 3.1 Zellfläche

Der Mittelwert der Zellfläche bei den unbehandelten bovinen Osteoblasten beträgt 2401 µm<sup>2</sup> (Standardabweichung 876 µm<sup>2</sup>) im Grundfluss und 2239 µm<sup>2</sup> (Standardabweichung ±812 µm<sup>2</sup>) bei Belastung. Bei den mit ML-7 inkubierten Osteoblasten zeigt sich eine Zellfläche von 2291 µm<sup>2</sup> (Standardabweichung ±874 µm<sup>2</sup>) im Grundfluss und 1843 µm<sup>2</sup> (Standard-



abweichung  $\pm 952 \mu\text{m}^2$ ) bei Belastung. Bei Belastung zeigen die mit ML-7 inkubierten Zellen eine signifikant geringere Zellfläche ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney) als die unbehandelten Osteoblasten (siehe Abbildung 13).

Tabelle 13: Zellflächenmittelwerte mit Standardabweichung (SD)

Zellflächen- mittelwerte ( $\mu\text{m}^2$ )	Kontrolle	ML-7
Grundfluss	2401 (SD $\pm 876$ ) $\mu\text{m}^2$	2239 (SD $\pm 812$ ) $\mu\text{m}^2$
Belastung	2291 (SD $\pm 874$ ) $\mu\text{m}^2$	1843 (SD $\pm 952$ ) $\mu\text{m}^2$

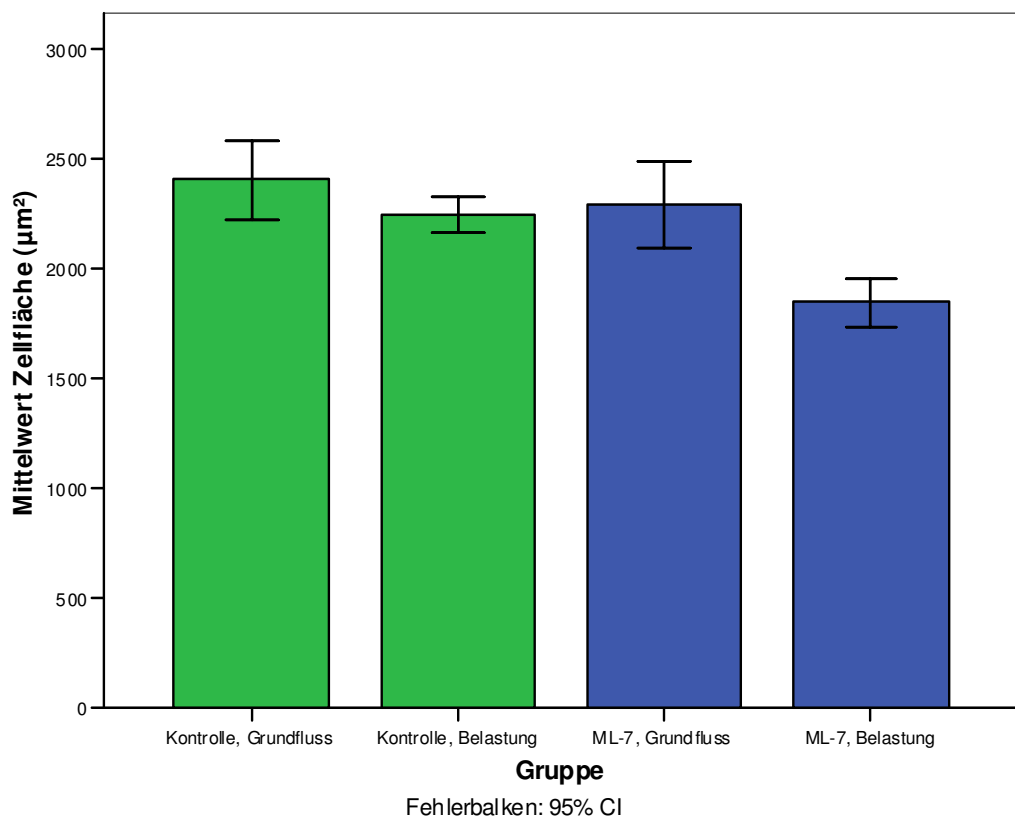


Abbildung 13: Mittelwerte der Zellflächen mit Konfidenzintervall (CI)

An den mit ML-7 inkubierten Zellen konnte ein Rückgang an Lamellopodien beobachtet werden, was die signifikant geringere Zellfläche erklärt (siehe Abbildung 14).

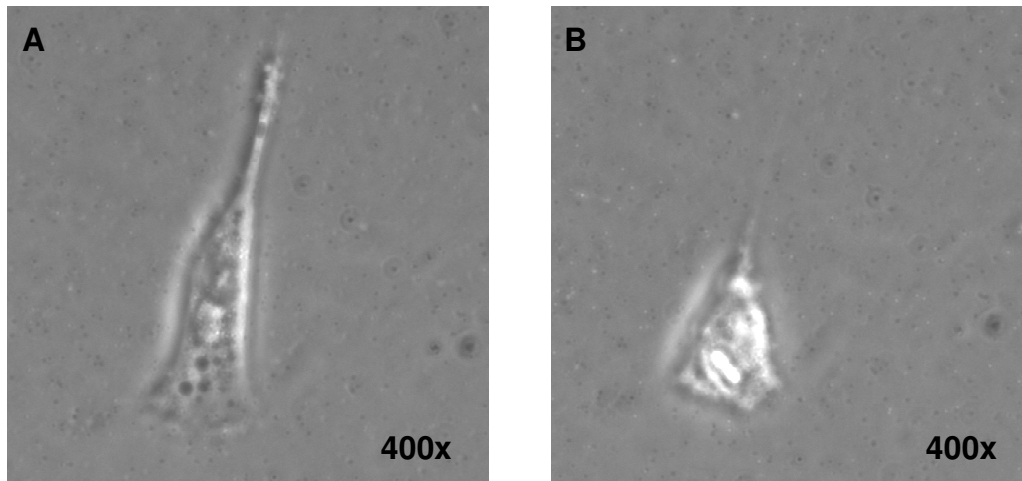


Abbildung 14: Phasenkontrastaufnahmen eines Osteoblasten. **A** Vor der Zugabe von ML-7 **B** Rückbildung von Lamellopodien während der Zugabe von ML-7

#### 3.2 Kraftverteilung in der Kontrollgruppe

Für die Auswertung der Zellkräfte wurde die berechnete Kraft pro Fläche in Dyne pro Quadratcentimeter ( $\text{dyn}/\text{cm}^2$ ) mit der Zellfläche multipliziert, um Zellen unterschiedlicher Größe miteinander vergleichen zu können. Nachfolgend werden die Kräfte in Nanonewton (nN) angegeben. Um abschätzen zu können, wie die Zellkräfte innerhalb einer Gruppe verteilt sind, wurden Histogramme erstellt. Ein Balken des Histogramms fasst die Häufigkeit der Messergebnisse in einem Bereich von jeweils 10 nN zusammen. Die Verteilung der Kräfte im Histogramm der Kontrollgruppe zeigt weder im Grundfluss noch bei Belastung eine Normalverteilung (siehe Abbildung 15).

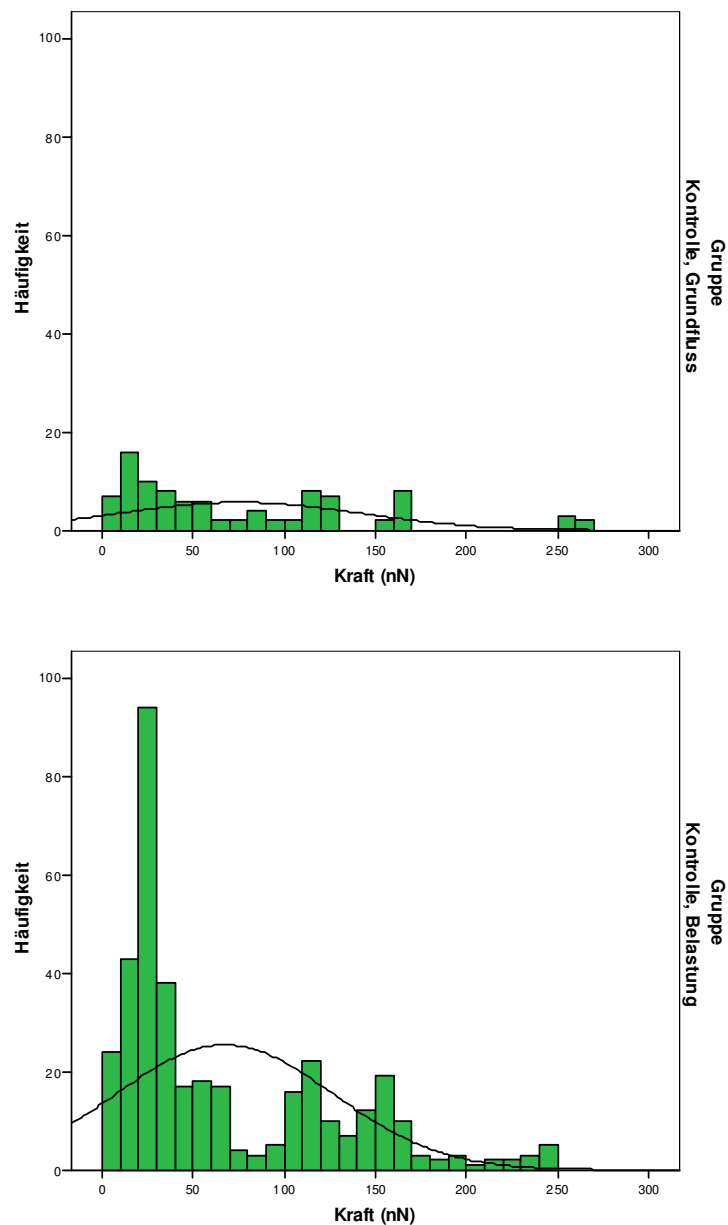


Abbildung 15: Histogramme der Kontrollgruppe mit Normalverteilungskurve

### 3.3 Kraftverteilung in der Versuchsgruppe

In der Versuchsgruppe zeigt sich im Grundfluss keine Normalverteilung, wohingegen sich bei Belastung annähernd eine Normalverteilung darstellt (Abbildung 16).

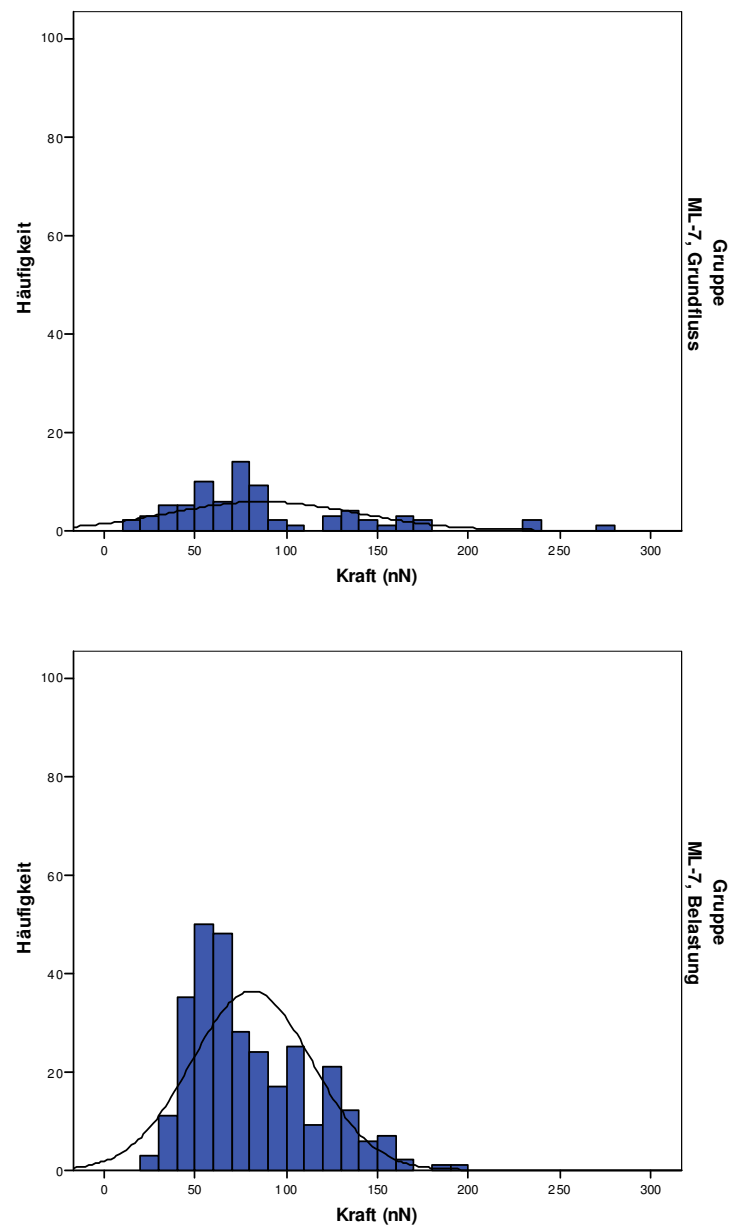


Abbildung 16: Histogramme Versuchsgruppe mit Normalverteilungskurve

#### 3.4 Auswertung der Kraftmittelwerte

Für die Auswertung der Kraftmittelwerte wurden diese in den Gruppen miteinander verglichen. Die Werte für die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 14 und Abbildung 17 dargestellt. Hierbei zeigen die mit ML-7 inkubierten Osteoblasten ein höheres Kraftniveau sowohl im Grundfluss

### 3 Ergebnisse

(um 12,9 % größerer Kraftbetrag) als auch unter Belastung (um 17,3 % größerer Kraftbetrag).

Tabelle 14: Kraftmittelwerte mit Standardabweichung (SD)

Kraftmittelwerte (nN)	Kontrolle	ML-7
Grundfluss	75 (SD $\pm 66$ ) nN	86 (SD $\pm 51$ ) nN
Belastung	67 (SD $\pm 60$ ) nN	81 (SD $\pm 33$ ) nN

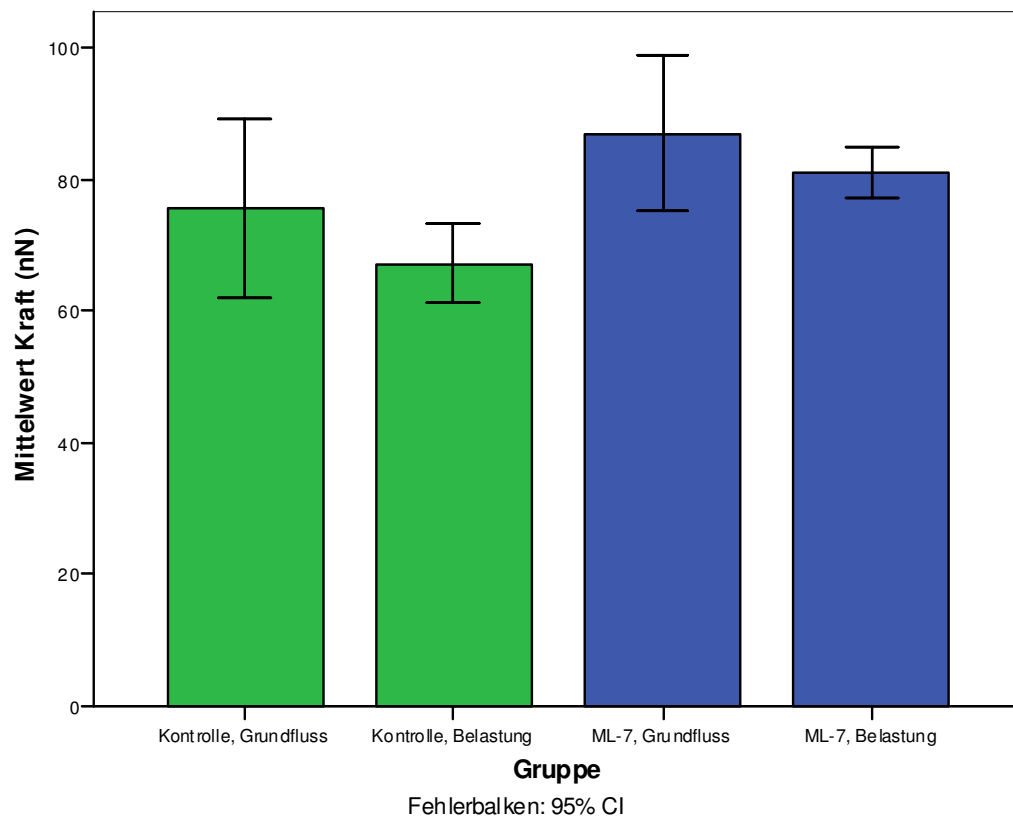


Abbildung 17: Kraftmittelwerte der Kontroll- und Versuchsgruppe mit Konfidenzintervall (CI)

Sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der Versuchsgruppe zeigt sich kein signifikanter Kraftunterschied beim Vergleich zwischen Grundfluss und Belastung. Beim Vergleich der ML-7-inkubierten Zellen mit der Kontrollgruppe zeigt sich jedoch ein signifikanter Kraftunterschied sowohl im Grundfluss ( $p = 0,012$ , Mann-Whitney) als auch bei Belastung ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney).

#### 3.5 Gruppenbildung für die Reaktionstypen

Um Zellgruppen zu unterscheiden, die durch die mechanische Stimulation mit einem Kraftanstieg, -verlust oder mit einer gleichbleibenden Kraft reagiert haben, wurden weitere Gruppen für die Reaktionstypen gebildet (siehe Abbildung 18). Bei den unbehandelten Osteoblasten stellte sich eine Zunahme des Kraftbetrags bei 5 von 19 Zellen (26,3 %) dar, 10 von 19 Zellen (52,6 %) reagierten mit einem Kraftverlust. Zellen, die keine Kraftänderung von mehr als 10 % des Mittelwertes zeigten, wurden der Gruppe mit gleichbleibender Kraft zugeteilt (siehe Tabelle 15 und Abbildung 18). Die Kontrollgruppe zeigte hierbei Kraftverluste bei Belastung im Vergleich zum Grundfluss im Bereich von 14 % (28 nN auf 24 nN) bis 136 % (100 nN auf 43 nN). Die Kraftzunahme lag bei 13 % (23 nN auf 26 nN) bis 35 % (15 nN auf 27 nN).

Tabelle 15: Reaktionstypen bei der Kontrollgruppe

Anzahl der Zellen (N)	Kontrolle	
Kraftzunahme	N = 5	26,3 %
Kraftabnahme	N = 10	52,6 %
Keine Kraftänderung	N = 4	21,1 %

### 3 Ergebnisse

Bei der Versuchsgruppe reagierten 7 von 15 Zellen (46,7 %) mit einer Kraftzunahme unter Belastung. Bei 8 von 15 Zellen (53,3 %) zeigte sich eine Kraftabnahme (siehe Tabelle 15 und Abbildung 18). Die ML-7-inkubierten Osteoblasten zeigten einen Kraftverlust von 11 % (71 nN auf 64 nN) bis 115 % (189 nN auf 88 nN). Die Kraftzunahme lag bei 10 % (59 nN auf 66 nN) bis 39 % (83 nN auf 136 nN).

Tabelle 16: Reaktionstypen bei der Versuchsgruppe

Anzahl der Zellen (N)	ML-7	
Kraftzunahme	N = 7	46,7 %
Kraftabnahme	N = 8	53,3 %
Keine Kraftänderung	N = 0	0,0 %

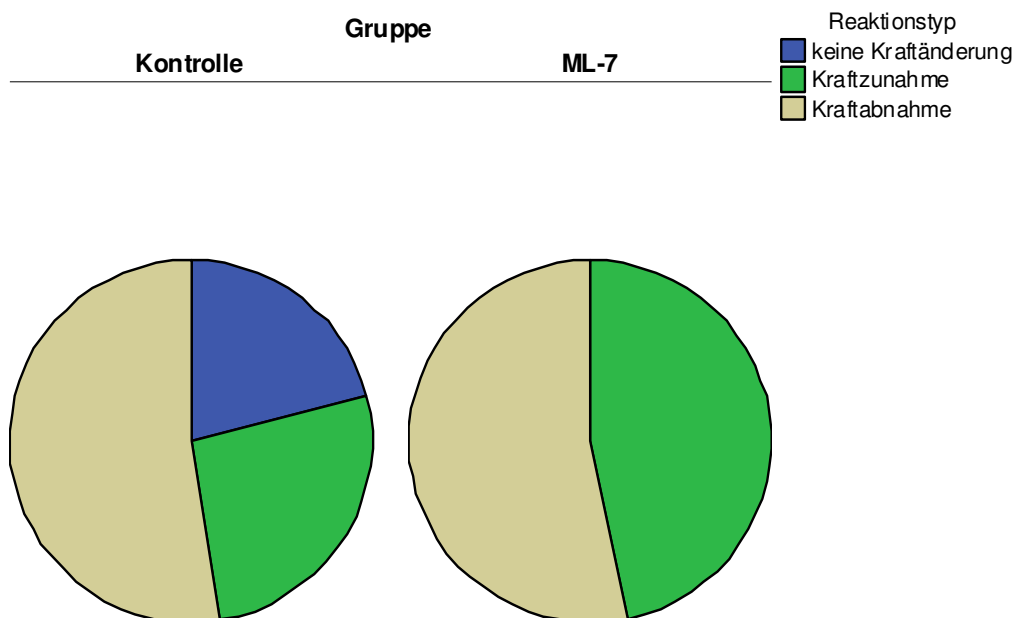


Abbildung 18: Reaktionstypen der Gruppen

### 3.6 Auswertung über die Zeit

Wird der Kraftverlauf über die Zeit betrachtet, zeigt sich in beiden Gruppen eine Kraftabnahme im Beobachtungszeitraum. Dieser Verlauf ist in Abbildung 19 dargestellt, wobei zum Zeitpunkt 0 (senkrechte Linie) die Belastung mit 30 dyn/cm<sup>2</sup> beginnt. Die Versuchsgruppe zeigt innerhalb von 15 Sekunden ab Belastungsbeginn einen steilen Kraftanstieg. Der Kraftverlauf (Korrelation der Zeit mit der Kraft, Kendall-Tau) ist nicht signifikant, weder in der Versuchsgruppe noch in der Kontrollgruppe.

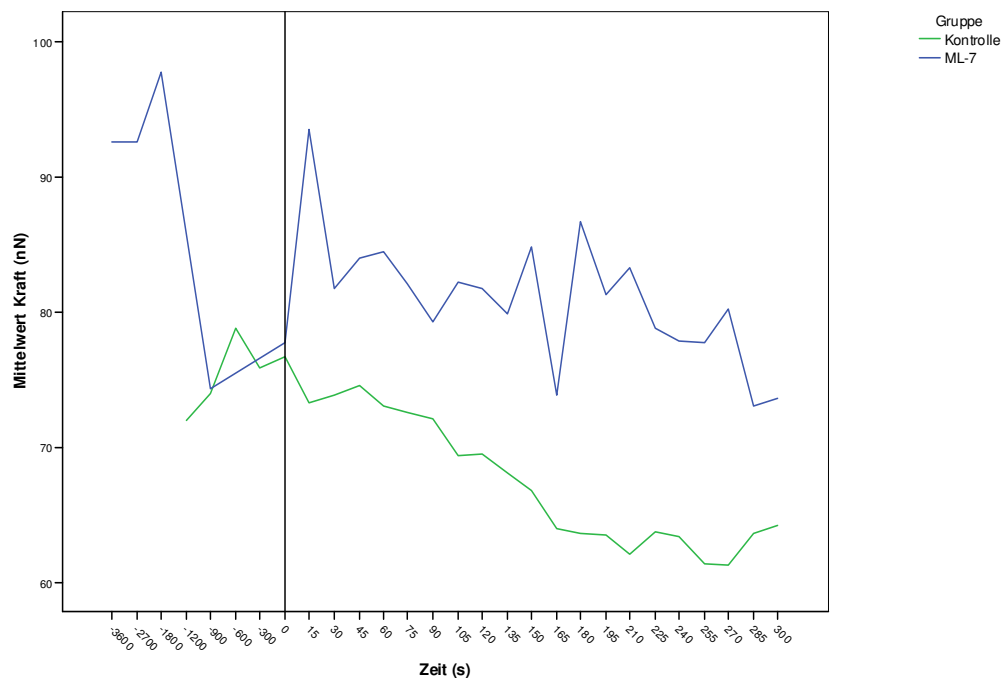


Abbildung 19: Kraftverlauf beider Gruppen über die Zeit

### 3.7 Auswertung über die Zeit für die Reaktionstypen der Kontrollgruppe

Werden die Reaktionstypen über die Zeit betrachtet, zeigt sich in der Kontrollgruppe bei allen Reaktionstypen eine stetige Veränderung der Kraft mit Beginn der Beobachtungsphase (siehe Abbildung 20). Zellen des



Reaktionstyps mit geringer Kraft zu Beginn der Beobachtung zeigen nach Belastung einen Kraftanstieg (nicht signifikant), wohingegen Zellen des Reaktionstyps mit hoher Kraft am Anfang der Beobachtung mit einem signifikanten Kraftverlust reagieren ( $p < 0,001$ , Kendall-Tau) bei Korrelation der Zeit mit der Kraft.

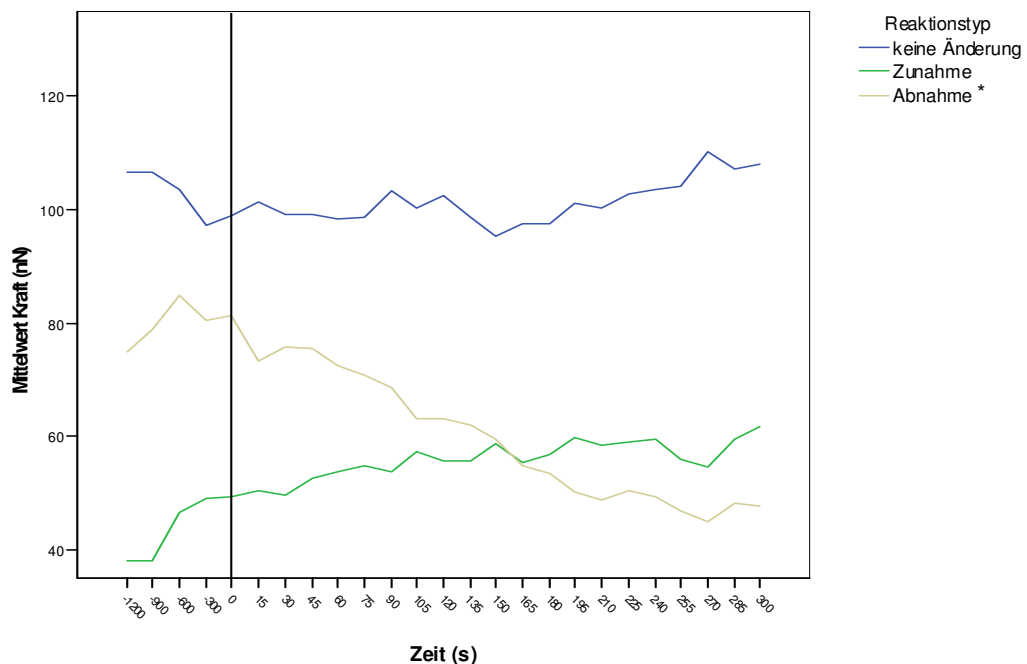
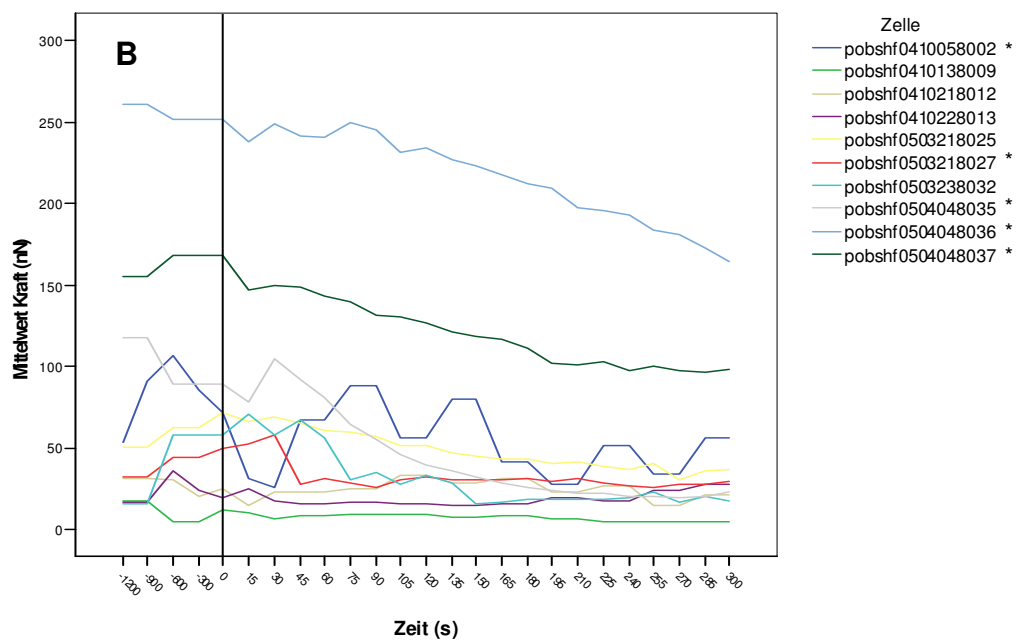
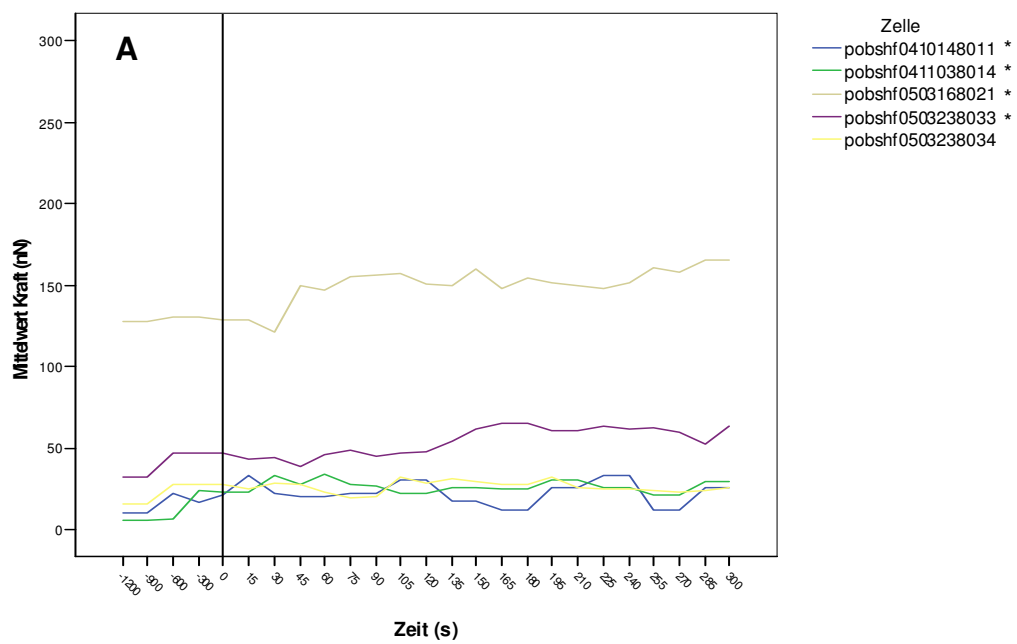


Abbildung 20: Kraftverlauf über die Zeit der Reaktionstypen bei der Kontrollgruppe (mit \* gekennzeichnete Verlauf ist signifikant)

Werden die Einzelzellen innerhalb der jeweiligen Reaktionstypen betrachtet (siehe Abbildung 21), zeigen sich stark unterschiedliche Ausgangskräfte (6 nN bis 261 nN, Mittelwert 72 nN, Standardabweichung  $\pm 71$  nN).

Beim Vergleich der Kraftmittelwerte der Einzelzellen im Grundfluss und bei Belastung reagierten 4 von 5 Zellen mit einer signifikanten Kraftzunahme ( $p = 0,004$  bis  $p = 0,041$ , Mann-Whitney) und 5 von 10 Zellen mit einer signifikanten Kraftabnahme ( $p = 0,001$  bis  $p = 0,021$ , Mann-Whitney).

### 3 Ergebnisse



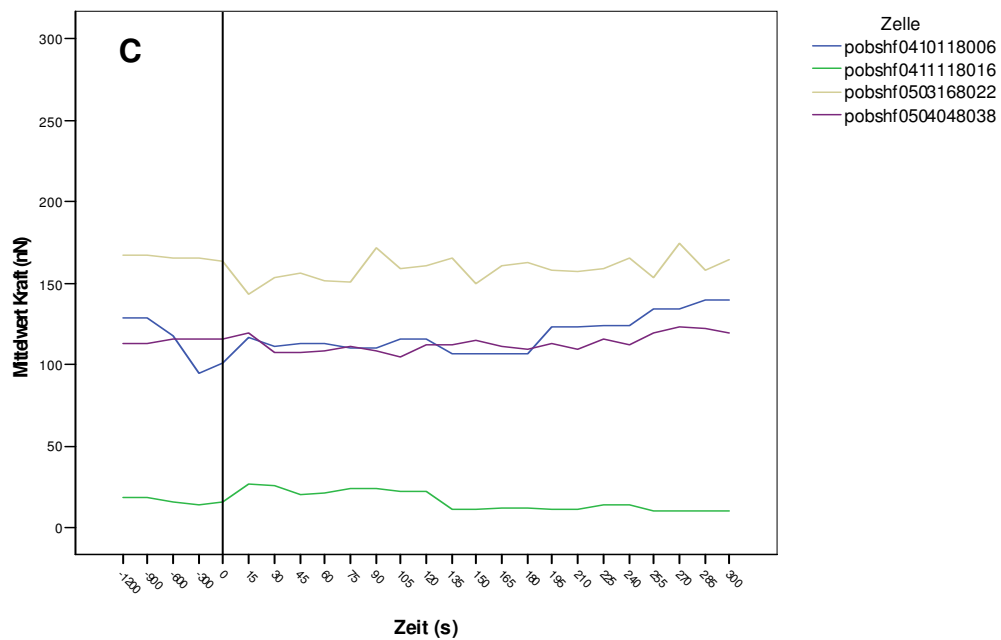


Abbildung 21: Kraftverlauf über die Zeit der Einzelzellen bei der Kontrollgruppe. **A** Kraftzunahme **B** Kraftabnahme **C** Keine Änderung (mit \* gekennzeichnete Zellen reagierten signifikant)

### 3.8 Auswertung über die Zeit für die Reaktionstypen der Versuchsgruppe

Bei der Versuchsgruppe zeigt sich ein sprunghafter Anstieg der Kraft innerhalb der ersten 15 Sekunden nach Belastungsbeginn. Der Reaktionstyp mit der Kraftabnahme zeigt einen stetigen Verlauf (siehe Abbildung 22). In der Versuchsgruppe zeigen die Zellen des Reaktionstyps mit einer hohen Ausgangskraft einen signifikanten Kraftverlust ( $p = 0,01$ , Kendall-Tau) und Zellen des Reaktionstyps mit einer geringen Ausgangskraft einen signifikanten Kraftanstieg ( $p = 0,023$ , Kendall-Tau) bei Korrelation der Zeit mit der Kraft.

### 3 Ergebnisse

---

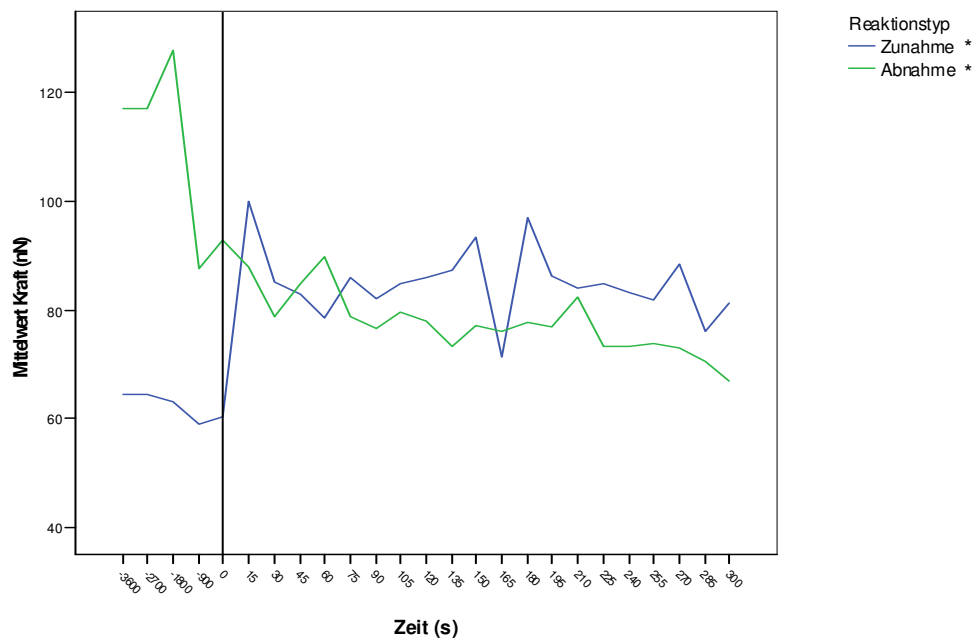


Abbildung 22 Kraftverlauf über die Zeit der Reaktionstypen der Versuchsgruppe (mit \* gekennzeichnete Verlauf ist signifikant)

Die Ausgangskräfte der Einzelzellen bei den ML-7-inkubierten Osteoblasten (siehe Abbildung 23) sind wie bei der Kontrollgruppe stark unterschiedlich (14 nN bis 232 nN, Mittelwert 93 nN, Standardabweichung  $\pm 58$  nN).

Beim Vergleich der Kraftmittelwerte der Einzelzellen im Grundfluss und bei Belastung reagierten 4 von 7 Zellen mit einer signifikanten Kraftzunahme ( $p = 0,001$  bis  $p = 0,010$ , Mann-Whitney) und 4 von 8 Zellen mit einer signifikanten Kraftabnahme ( $p = 0,008$  bis  $p = 0,049$ , Mann-Whitney).

### 3 Ergebnisse

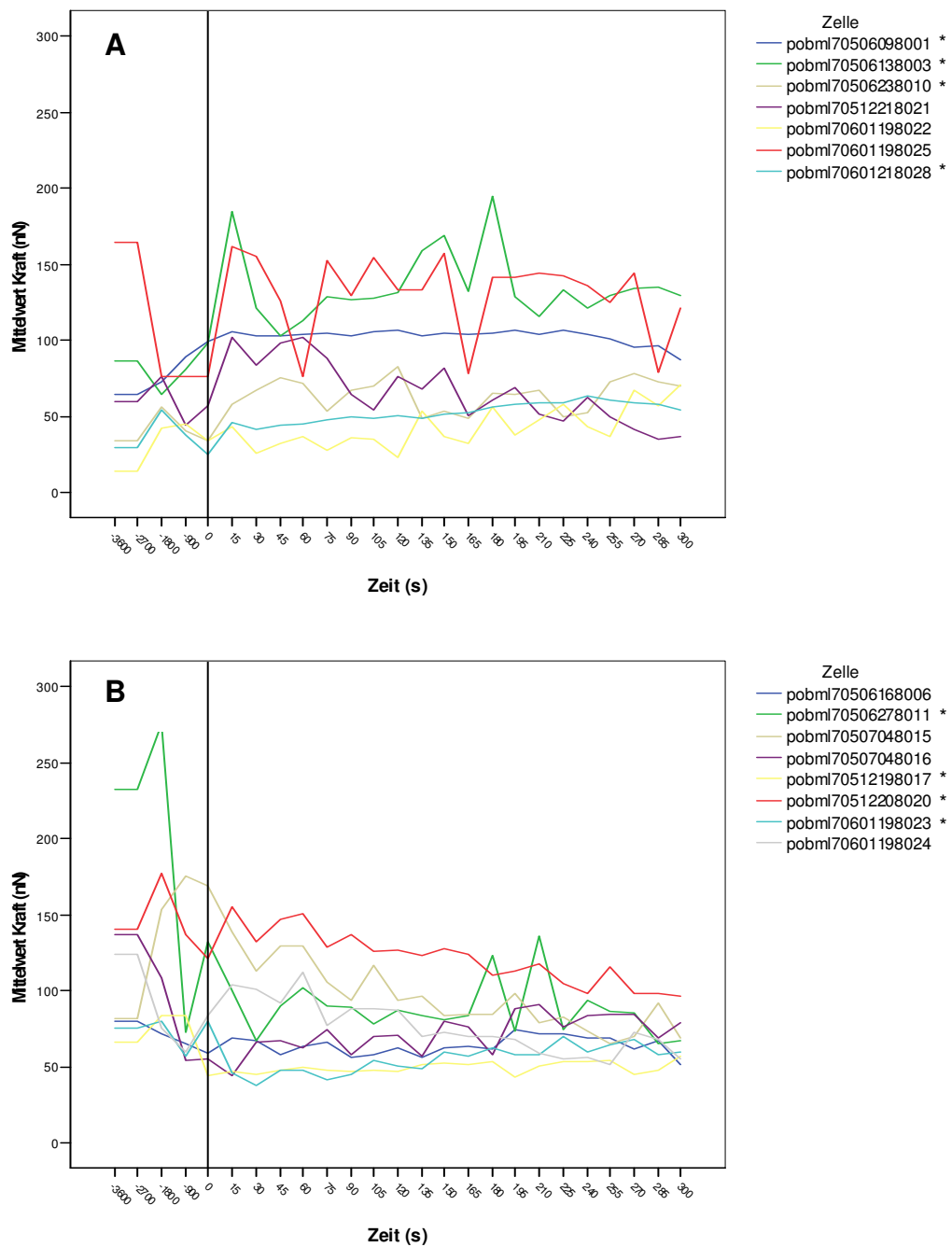


Abbildung 23: Kraftverlauf über die Zeit der Einzelzellen bei der Versuchsgruppe. **A** Kraftzunahme **B** Kraftabnahme (mit \* gekennzeichnete Zellen reagierten signifikant)

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Myosin II auf die Kraftentwicklung in primären bovinen Osteoblasten bei Belastung durch Scherspannung untersucht. Durch Blockade der Myosin-Leichtketten-Kinase wurden bei geringerer Zellfläche signifikant höhere Kräfte beobachtet als bei den unbehandelten Osteoblasten. Dies deutet auf eine von der Myosin-Leichtketten-Kinase unabhängige Kraftentwicklung im Zellzentrum von Osteoblasten hin. Der frühe zeitliche stetige Kraftverlauf bei den unbehandelten Osteoblasten lässt einen sensiblen Mechanorezeptor vermuten, der auf Scherspannungen von unter 2 dyn/cm<sup>2</sup> anspricht. Zellen mit großen Kräften am Anfang des Experiments zeigten einen signifikanten Kraftverlust und Zellen der Versuchsgruppe mit kleinen Kräften einen signifikanten Kraftanstieg.

### 4.1 Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7

Die mit ML-7 inkubierten Osteoblasten zeigten sowohl während der Belastung als auch im Grundfluss einen signifikant höheren Kraftbetrag im Vergleich zu den unbehandelten Osteoblasten. Die gewählte ML-7-Konzentration von 1 µM stützt sich auf die Annahme, dass die Zelle bei fehlenden Zellausläufern keine Kräfte auf das Substrat ausüben kann. Versuche an Fibroblasten haben gezeigt, dass ML-7 zu einem Rückgang an Zellausläufern und zu einer Verringerung der Zellsteifigkeit führt (Schafer et al., 2005). Untersuchungen belegen weiterhin eine Abhängigkeit der Zellmotilität und damit der Kraftentwicklung von der Aktin-Myosin-Interaktion im Zytoskelett (Jay et al., 1995; Oliver et al., 1999; Yam et al., 2007). Die fokalen Adhäsionen werden bei Bewegung der Zelle im hinteren Teil durch Zug gelöst, und Aktin wird reorganisiert (Rubinstein et al., 2009; Yam et al., 2007).

Eine mögliche Erklärung für die dennoch vorhandene Zellkraft ist ein intaktes Zytoskelett im Zentrum der Zelle mit konsekutiver Spannung auf die restlichen fokalen Adhäsionen. Der Mechanismus könnte eine Myosin-Leichtketten-Kinase-unabhängige Aktivierung von Myosin II über die GTPase Rho sein. Arbeiten, die diese These unterstützen, wurden bereits an Fibroblasten durchgeführt. Katoh et al. konnten in einer vergleichenden Untersuchung zwischen der Rho-Kinase- und der Myosin-Leichtketten-Kinase-abhängigen Kontraktion von Aktin-Stressfasern vom Aktivierungsweg abhängige Zellbereiche definieren (Katoh et al., 2001; Katoh et al., 2011). Demnach führte die Rho-Kinase zu einer zentral betonten Stressfaseraktivierung, wohingegen die Myosin-Leichtketten-Kinase in der Zellperipherie für die Myosin II-Aktivität verantwortlich gemacht wird.

Der Aktivierungsweg über Rho könnte auch die insgesamt erhöhte Zellkraft erklären. Die Aktivierung von Myosin II über Rho wird sowohl über eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette als auch über eine Inaktivierung der Myosin-Phosphatase reguliert (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Die fehlende Dephosphorylierung der Myosin-Leichtkette durch die Myosin-Phosphatase führt zu einer Bindung von Myosin II an Aktin. Dies könnte durch einen ungehemmten Querbrückenzyklus des Aktin-Myosin-Komplexes zu einer Verstärkung der Zellspannung führen.

Diese Annahme wird gestützt durch Versuche an mechanisch nicht belasteten Fibroblasten nach Blockade der Myosin-Leichtketten-Kinase. Beningo et al. konnten hierbei keine Änderung der Zellkräfte beobachten, wohingegen nach Blockade der Rho-Kinase ein Abfall der Zellkraft resultierte (Beningo et al., 2006).

Die mit ML-7 inkubierten Osteoblasten reagierten mit einem sprunghaften Kraftanstieg, der zu Beginn der Belastung einsetzte. Durch die vermutlich erhöhte Zellspannung könnte auch die Reizschwelle für eine mechanische Stimulation herabgesetzt worden sein beziehungsweise der mechanische Stimulus wurde verstärkt. Der Mechanismus zur Herabsetzung der Reizschwelle wurde bereits von Jones et al. beschrieben (Jones et al.,

1995). Durch Erhöhung der Zellspannung kann ein potentieller Mechanosensor demarkiert werden, indem die Zellmembran-deformierungen minimiert werden. Weiterhin wurde eine Theorie der Signalverstärkung einer Dehnung in Osteozyten durch eine erhöhte Zytoskelettsteifigkeit beschrieben (Han et al., 2004). Han et al. setzten für ihre Annahmen jedoch voraus, dass es sich um Osteozyten mit Zellausläufern im lakuno-kanalikulären System handelt und nicht wie in dieser Arbeit um Osteoblasten ohne Zellausläufer.

### 4.2 Primäre bovine Osteoblasten

Bei den unbehandelten Osteoblasten reagierten 5 von 19 Zellen (26,3 %) und bei den mit ML-7 inkubierten Zellen 7 von 15 Zellen (46,7 %) mit einem Kraftanstieg. Diese Werte sind zumindest bei den unbehandelten Osteoblasten mit den Ergebnissen von Rieger vergleichbar (Rieger, 2004). Rieger zeigte einen Kraftanstieg in 1 von 5 Osteoblasten (20 %), jedoch bei einer deutlich höheren Scherspannungsbelastung von 65 dyn/cm<sup>2</sup>.

Der stetige Kraftanstieg bei den unbehandelten Osteoblasten könnte Ausdruck einer Abhängigkeit der Feinregulation der Kraftrezeption durch die Myosin-Leichtketten-Kinase in der Zellperipherie sein. Die Myosin-Leichtketten-Kinase ist jedoch abhängig von der Anwesenheit von Kalzium für ihre Funktion (Katoh et al., 2011). Untersuchungen von Rieger an primären bovinen Osteoblasten zeigten einen Kalziumanstieg erst nach 20 Sekunden bei einer Scherspannung von 25 dyn/cm<sup>2</sup> und eine Krafterhöhung in einer von fünf untersuchten Zellen nach 160 Sekunden (Rieger, 2004). Die Bedeutung der kalziumabhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase in diesem Zusammenhang scheint daher in den Hintergrund zu treten. Als möglichen alternativen Weg der frühen Kraftentwicklung bei Scherspannungen unter 2 dyn/cm<sup>2</sup> könnte auch hier eine Aktivierung der kalziumunabhängigen Rho-Kinase sein (Katoh et al., 2011). Die Aktivierung von



RhoA wurde von Hamamura et al. unter Scherspannungsbelastungen von  $10 \text{ dyn/cm}^2$  nachgewiesen (Hamamura et al., 2012). Hierzu wurden osteoblastenähnliche Zellen über 1 Stunde belastet. Der Nachweis einer Signalkaskade über Inositoltriphosphat und der mitogen-activated protein kinase durch Hamamura et al. kann auch für eine konsekutive Aktivierung der Rho-Kinase sprechen.

Ebenfalls könnte die intakte Konfiguration des Zytoskeletts im Vergleich zu den ML-7-inkubierten Osteoblasten eine entscheidende Rolle für die Kraftentwicklung einnehmen. Hier ist vor allem an eine Rezeption über die an das Zytoskelett gekoppelten Integrine zu denken, wobei über diesen Mechanismus die minimale nötige Scherspannung für eine Zellantwort zu bestimmen bleibt. Wang et al. konnten in Endothelzellen, die durch eine Zugspannung an der extrazellulären Matrix mechanisch belastet wurden, eine schnelle Aktivierung der Src Tyrosinkinase in fokalen Adhäsionen nachweisen (Wang et al., 2005). Ferner wurde eine sich ausbreitende Aktivierung der Src über den Ort der Belastung hinaus beobachtet. Über welche intrazellulären Kaskaden es über die Integrinaktivierung zu einer schnellen Kraftentwicklung kommen könnte, ist bislang nicht beschrieben.

Insgesamt scheint die Kraftentwicklung durch Scherspannung in Osteoblasten mehr einem Regelkreislauf als einem Reiz-Antwort-Mechanismus zu unterliegen. Dafür spricht der beobachtete stetige Kraftanstieg in den unbehandelten Osteoblasten. Auch der Kraftverlust bei den Zellen mit hohen Ausgangskräften und der Kraftanstieg bei den Zellen mit geringer Ausgangskraft können für diesen Regelkreislauf sprechen. Als Regelgröße ist hier die resultierende Kraft denkbar. Wirkt eine von außen angreifende Kraft auf die Zelle, wird die Zelle entweder bewegt oder deformiert. Aufgrund der Anhaftung der Zelle wird die Kraft als Spannung auf die Zelloberfläche wirken und über das Zytoskelett an die Integrine und die extrazelluläre Matrix weitergegeben werden (Ingber, 1997). Erhöht die Zelle nun die innere Spannung durch Ausbau der Aktin-Stressfasern, wird der von außen anliegenden Spannung entgegen-

gewirkt, bis die resultierende Kraft den Sollwert erreicht hat. Bereits 1995 postulierten Banes et al. einen solchen Feedback-Mechanismus über die Spannung des Zytoskeletts (Banes et al., 1995). Ein ähnlicher Mechanismus könnte sowohl für die Dehnung von Zellen über die extrazelluläre Matrix als auch für die Rezeption der Untergrundsteifigkeit einer Zelle (Durotaxis) diskutiert werden. Hier wird die Regelgröße (resultierende Kraft) über die extrazelluläre Matrix eingestellt. Bei weichen Untergründen sind kleinere Spannungen nötig um den Sollwert einzustellen als bei steiferen Untergründen. Die Beobachtungen, dass fokale Adhäsionen kleiner sind oder fehlen sowie die Aktivität der fokalen Adhäsionskinase reduziert ist, wenn Zellen auf einem weichen Substrat kultiviert werden, bekräftigen diese Theorie (Paszek et al., 2004).

Zusammenfassend erscheint eine genaue Zuordnung der einzelnen Strukturen für die Zellkraft zu einer Kraftgenerierung einerseits oder zu einer Mechanotransduktion andererseits aufgrund der voneinander abhängigen Regulierungen noch schwierig. Weitere Untersuchungen werden darüber Aufschluss geben.

### **4.3 Methodik**

Der Vorteil der verwendeten Methode mit wenigen auf Polyacrylamidgel anheftenden Zellen liegt in der Möglichkeit, das Kraftverhalten einer einzelnen Zelle zu untersuchen. Dadurch entstehen jedoch unphysiologische Verhältnisse mit einer aus dem Verbund herausgelösten Zelle, die nicht in einer dreidimensionalen organischen Umgebung mit anderen Zellen in Verbindung steht. Barron et al. zeigten eine erhöhte Genexpression von Osteopontin (OPN) und fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in Scherspannungsuntersuchungen an Osteoblasten, die in einer dreidimensionalen Matrix verankert waren im Unterschied zu Osteoblasten die flach kultiviert wurden (Barron et al., 2010).

Ferner stellt der statische Flüssigkeitsfluss mit konstanter Scherkraft keine In-vivo-Bedingung dar. Jaasma et al. untersuchten die Auswirkungen von statischer und dynamischer Scherspannungen auf Osteoblasten und konnten bei dynamischen Belastungen eine höhere Expression von Cyclooxygenase-2, Prostaglandin E2 und Osteopontin nachweisen (Jaasma et al., 2008).

Zusätzlich entspricht die tatsächlich entstehende Scherspannung über der Zelle nicht der berechneten Scherspannung. Durch die Zellform und die Zellmembranbeschaffenheit (Hyman, 1972) sowie unebenem Untergrund durch zahlreiche anheftende Zellen außerhalb des Beobachtungsraumes (Satcher et al., 1992) wird der Flüssigkeitsfluss und somit auch die Scherspannung in schwer abschätzbarer Weise verändert.

Unterschiede im Ansprechverhalten der Osteoblasten können zum einen dadurch entstehen, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklen befinden (Bizzarri et al., 1994). Zum anderen könnte trotz erfolgter Phänotypisierung eine Mischkultur unterschiedlicher Zelltypen vorliegen (Wong, 1990). Als Folge lägen Zellen mit Unterschieden in der Proteinexpression unter Einbezug von Strukturproteinen der Signaltransduktion vor.

### **4.4 Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine von der Zellperipherie unabhängige Mechanotransduktion in Osteoblasten hin. Weiterführende Experimente könnten durch die Rho-Kinase regulierte Zytoskelettstrukturen unter mechanischer Belastung untersuchen. Ferner scheinen die fokalen Adhäsionen eine zentrale Rolle in der Mechanotransduktion einzunehmen. Untersuchungen zu Vinculin als Bindeglied in reifenden fokalen Adäsionen in durch Scherspannung belasteten Osteoblasten wurden bereits durchgeführt (Tan et al., 2010). Neben Scherspannungen für die mechanische Stimulation von Osteoblasten können Experimente mit einer Belastung durch Dehnung weiterführende Erkenntnisse liefern. Durch die unter-

schiedlichen Stimulationsorte (Zelloberfläche bei Scherspannung und Anheftungsfläche bei Dehnung) ließen sich Aussagen zur Bedeutung der Zellstruktur bei der Mechanotransduktion machen. Am Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik durchgeführte, bislang unveröffentlichte Untersuchungen an Osteoblasten, die durch Dehnung belastet wurden, zeigten mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse. Es wurden unterschiedliche Reaktionstypen beschrieben, wobei 4 von 23 Zellen mit einem Kraftanstieg reagierten und 11 von 23 Zellen mit einem langsamen oder schnellen Kraftverlust reagierten (Schmenn, 2012, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse deuten auf eine von der Stimulationsart unabhängige Kraftentwicklung in Osteoblasten hin.

## 5 Zusammenfassung

Knochen als dynamisches Gewebe kann durch mechanische Belastung zugunsten des Knochenaufbaus umstrukturiert werden. Im lakuno-kanalikulären System können unter Belastung Flüssigkeitsverschiebungen entstehen, die Scherspannungen an Knochenzellen erzeugen. Osteoblasten sind in der Lage, diese mechanischen Stimuli zu erfassen und in ein biochemisches Signal zu transduzieren. Den Mechanismus dieser Mechanotransduktion und die beteiligten Strukturen zu identifizieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und der vorliegenden Arbeit.

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer Myosin II-abhängigen Kraftentwicklung in primären bovinen Osteoblasten durch mechanische Stimulation mit Scherspannung. Dazu wurde der kontraktile Teil des Zytoskeletts mit ML-7, einem Inhibitor der Myosin-Leichtketten-Kinase, gehemmt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Für die Stimulation wurde eine Parallelflussskammer mit konstanter Scherspannung verwendet. Der Beobachtungszeitraum vor Beginn der Belastungsphase betrug 20 Minuten bei den unbehandelten Osteoblasten als Kontrollgruppe und 60 Minuten bei den mit ML-7 inkubierten Osteoblasten als Versuchsgruppe. Der Mediumdurchsatz vor Beginn der Belastungsphase entsprach einer Scherspannung von unter  $2 \text{ dyn/cm}^2$ . In der Belastungsphase wurde eine Scherspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  für 5 Minuten appliziert. Die Registrierung der Zellkräfte erfolgte durch die Methode der Zugkraftmikroskopie. Hierbei wird ein elastisches Polyacrylamidgel durch die Zelle verformt und die Zellkraft über die Deformierung des Gels berechnet.

Bei den unbehandelten Osteoblasten wurden Kraftänderungen in 15 von 19 Zellen (78,9 %) beobachtet, wobei 5 Zellen (26,3 %) eine frühe Kraftzunahme schon im Beobachtungszeitraum vor der Belastungsphase zeigten. Die mit dem Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor behandelten Zellen zeigten eine verringerte Zellgröße durch den Rückgang an Zellausläufern.

Eine Kraftänderung zeigten 15 Zellen (100 %), wobei 7 Zellen (46,7 %) eine Kraftzunahme bei Belastung durch Scherspannung zeigten. Die Zellgruppe mit großen Kräften am Anfang des Experiments zeigte einen signifikanten Kraftverlust und die Zellgruppe in der Versuchsgruppe mit kleinen Kräften einen signifikanten Kraftanstieg.

Diese Ergebnisse weisen auf eine von der Myosin-Leichtketten-Kinase unabhängige Kraftentwicklung im Zellzentrum von Osteoblasten hin. Der frühe zeitliche Kraftanstieg bei den unbehandelten Osteoblasten spricht für einen sensiblen Mechanismus, der bei Scherspannungen unter  $2 \text{ dyn/cm}^2$  anspricht.

## Literaturverzeichnis

**Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Nijweide, P. J., Vrijheid-Lammers, T., Alblas, M. J. und Burger, E. H.** (1996). Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 62-8.

**Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. und Kaibuchi, K.** (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-9.

**Aubin, J. E.** (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* **2**, 81-94.

**Bakker, D. P., van der Plaats, A., Verkerke, G. J., Busscher, H. J. und van der Mei, H. C.** (2003). Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6280-7.

**Baldwin, K. M., White, T. P., Arnaud, S. B., Edgerton, V. R., Kraemer, W. J., Kram, R., Raab-Cullen, D. und Snow, C. M.** (1996). Musculoskeletal adaptations to weightlessness and development of effective countermeasures. *Med Sci Sports Exerc* **28**, 1247-53.

**Banes, A. J., Tsuzaki, M., Yamamoto, J., Fischer, T., Brigman, B., Brown, T. und Miller, L.** (1995). Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* **73**, 349-65.

**Bar-Shavit, Z.** (2007). The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* **102**, 1130-9.

**Barron, M. J., Tsai, C. J. und Donahue, S. W.** (2010). Mechanical stimulation mediates gene expression in MC3T3 osteoblastic cells differently in 2D and 3D environments. *J Biomech Eng* **132**, 041005.

**Beningo, K. A., Hamao, K., Dembo, M., Wang, Y. L. und Hosoya, H.** (2006). Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* **456**, 224-31.

**Berridge, M. J.** (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**, 345-60.

**Bizzarri, C. und Civitelli, R.** (1994). Activation of the Ca<sup>2+</sup> message system by parathyroid hormone is dependent on the cell cycle. *Endocrinology* **134**, 133-40.

**Boutahar, N., Guignandon, A., Vico, L. und Lafage-Proust, M. H.** (2004). Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation. *J Biol Chem* **279**, 30588-99.

**Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M. und Jo, H.** (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1113-22.

**Busscher, H. J. und van der Mei, H. C.** (2006). Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin Microbiol Rev* **19**, 127-41.

**Carmeliet, G., Vico, L. und Bouillon, R.** (2001). Space flight: a challenge for normal bone homeostasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **11**, 131-44.

**Carvalho, R. S., Scott, J. E., Suga, D. M. und Yen, E. H.** (1994). Stimulation of signal transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* **9**, 999-1011.

**Charras, G. T., Williams, B. A., Sims, S. M. und Horton, M. A.** (2004). Estimating the sensitivity of mechanosensitive ion channels to membrane strain and tension. *Biophys J* **87**, 2870-84.

**Chiquet, M., Renedo, A. S., Huber, F. und Fluck, M.** (2003). How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* **22**, 73-80.

**Chrzanowska-Wodnicka, M. und Burridge, K.** (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* **133**, 1403-15.

**Cohen, M. M., Jr.** (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* **140**, 2646-706.

**Connell, L. E. und Helfman, D. M.** (2006). Myosin light chain kinase plays a role in the regulation of epithelial cell survival. *J Cell Sci* **119**, 2269-81.

**Cooper, J. A.** (1991). The role of actin polymerization in cell motility. *Annu Rev Physiol* **53**, 585-605.



**Cowin, S. C., Weinbaum, S. und Zeng, Y.** (1995). A case for bone canaliculi as the anatomical site of strain generated potentials. *J Biomech* **28**, 1281-97.

**Curtze, S., Dembo, M., Miron, M. und Jones, D. B.** (2004). Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J Cell Sci* **117**, 2721-9.

**Dembo, M. und Wang, Y. L.** (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* **76**, 2307-16.

**Dillaman, R. M., Roer, R. D. und Gay, D. M.** (1991). Fluid movement in bone: theoretical and empirical. *J Biomech* **24 Suppl 1**, 163-77.

**Doty, S. B.** (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* **33**, 509-12.

**Duncan, R. L. und Hruska, K. A.** (1994). Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* **267**, F909-16.

**Duncan, R. L. und Turner, C. H.** (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* **57**, 344-58.

**Elias, R. V., Sezate, S. S., Cao, W. und McGinnis, J. F.** (2004). Temporal kinetics of the light/dark translocation and compartmentation of arrestin and alpha-transducin in mouse photoreceptor cells. *Mol Vis* **10**, 672-81.

**Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. und Discher, D. E.** (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-89.

**Fan, X., Roy, E., Zhu, L., Murphy, T. C., Ackert-Bicknell, C., Hart, C. M., Rosen, C., Nanes, M. S. und Rubin, J.** (2004). Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology* **145**, 751-9.

**Frost, H. M.** (1987). Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec* **219**, 1-9.

**Glücksman, A.** (1939). The role of tension and pressure in chondrogenesis. Studies on bone mechanics in vitro. *Anatomical Record* **73**, 39-56.

**Gross, D., Hauger, W., Schröder, J. und Wall, W. A.** (2011). Technische Mechanik 2: Elastostatik. Berlin, Heidelberg: Springer.

**Gross, T. S. und Rubin, C. T.** (1995). Uniformity of resorptive bone loss induced by disuse. *J Orthop Res* **13**, 708-14.

**Guharay, F. und Sachs, F.** (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* **352**, 685-701.

**Haapasalo, H., Kontulainen, S., Sievanen, H., Kannus, P., Jarvinen, M. und Vuori, I.** (2000). Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change in volumetric bone density: a peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players. *Bone* **27**, 351-7.

**Hamamura, K., Swarnkar, G., Tanjung, N., Cho, E., Li, J., Na, S. und Yokota, H.** (2012). RhoA-Mediated Signaling in Mechanotransduction of Osteoblasts. *Connect Tissue Res*.

**Han, Y., Cowin, S. C., Schaffler, M. B. und Weinbaum, S.** (2004). Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16689-94.

**Harris, A. K., Wild, P. und Stopak, D.** (1980). Silicone rubber substrate: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **208**, 177-9.

**Hill, T. L. und Kirschner, M. W.** (1982). Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 490-4.

**Hoberg, M., Gratz, H. H., Noll, M. und Jones, D. B.** (2005). Mechanosensitivity of human osteosarcoma cells and phospholipase C beta2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 142-9.

**Hochmuth, R. M., Mohandas, N. und Blackshear, P. L., Jr.** (1973). Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J* **13**, 747-62.

**Hoey, D. A., Chen, J. C. und Jacobs, C. R.** (2012). The primary cilium as a novel extracellular sensor in bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 75.

**Hughes, D. E., Salter, D. M., Dedhar, S. und Simpson, R.** (1993). Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* **8**, 527-33.

**Hung, C. T., Pollack, S. R., Reilly, T. M. und Brighton, C. T.** (1995). Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow. *Clin Orthop Relat Res*, 256-69.

**Hyman, W. A.** (1972). Shear flow over a protrusion from a plane wall. *J Biomech* **5**, 45-8.

**Ingber, D. E.** (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* **59**, 575-99.

**Ingber, D. E.** (2003). Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1472-4.

**Ingber, D. E.** (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J* **20**, 811-27.

**Jaasma, M. J. und O'Brien, F. J.** (2008). Mechanical stimulation of osteoblasts using steady and dynamic fluid flow. *Tissue Eng Part A* **14**, 1213-23.

**Jalali, S., Li, Y. S., Sotoudeh, M., Yuan, S., Li, S., Chien, S. und Shyy, J. Y.** (1998). Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 227-34.

**Jay, P. Y., Pham, P. A., Wong, S. A. und Elson, E. L.** (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci* **108** ( Pt 1), 387-93.

**Jin, Z. G., Wong, C., Wu, J. und Berk, B. C.** (2005). Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 12305-9.

**Jones, D., Leivseth, G. und Tenbosch, J.** (1995). Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol* **73**, 525-34.

**Jones, D. B. und Bingmann, D.** (1991). How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and Methods* **1**, 329-340.

**Jones, D. B. und Scholuebbers, J. G.** (1987). Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress effect in bone. *Calcif. Tiss.Int.* **41**, supp p4.

**Jones, H. H., Priest, J. D., Hayes, W. C., Tichenor, C. C. und Nagel, D. A.** (1977). Humeral hypertrophy in response to exercise. *J Bone Joint Surg Am* **59**, 204-8.

**Kamm, K. E. und Stull, J. T.** (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 593-620.

**Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Beck, A., Claes, L. und Ignatius, A.** (2002). Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech* **35**, 873-80.

**Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. und Fujiwara, K.** (2001). Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1669-79.

**Katoh, K., Kano, Y. und Noda, Y.** (2011). Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J R Soc Interface* **8**, 305-11.

**Kawai, T., Nomura, F., Hoshino, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. und Akira, S.** (1999). Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene* **18**, 3471-80.

**Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K. et al.** (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-8.

**Kobayashi, T. und Sokabe, M.** (2010). Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 669-76.

**Kodama, Y., Umemura, Y., Nagasawa, S., Beamer, W. G., Donahue, L. R., Rosen, C. R., Baylink, D. J. und Farley, J. R.** (2000). Exercise and mechanical loading increase periosteal bone formation and whole bone strength in C57BL/6J mice but not in C3H/HeJ mice. *Calcif Tissue Int* **66**, 298-306.

**Krieger, J., Schleicher, S., Strotmann, J., Wanner, I., Boekhoff, I., Raming, K., De Geus, P. und Breer, H.** (1994). Probing olfactory receptors with sequence-specific antibodies. *Eur J Biochem* **219**, 829-35.

**Kufahl, R. H. und Saha, S.** (1990). A theoretical model for stress-generated fluid flow in the canaliculi-lacunae network in bone tissue. *J Biomech* **23**, 171-80.

**Kwon, R. Y., Temiyasathit, S., Tummala, P., Quah, C. C. und Jacobs, C. R.** (2010). Primary cilium-dependent mechanosensing is mediated by adenylyl cyclase 6 and cyclic AMP in bone cells. *Faseb J* **24**, 2859-68.

**Landau, L. D. und Lifshitz, E. M.** (1986). Theory of Elasticity. *Pergamon Press* **7**.

**Lanyon, L. E. und Rubin, C. T.** (1984). Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech* **17**, 897-905.

**Li, J., Duncan, R. L., Burr, D. B. und Turner, C. H.** (2002). L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo. *J Bone Miner Res* **17**, 1795-800.

**Li, Y., Hu, Z. und Li, C.** (1993). New Method for Measuring Poisson's Ratio in Polymer Gels. *Journal Of Applied Polymer Science* **50**, 1107–1111.

**Li, Y. J., Batra, N. N., You, L., Meier, S. C., Coe, I. A., Yellowley, C. E. und Jacobs, C. R.** (2004). Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Orthop Res* **22**, 1283-9.

**Lin, C., Jiang, X., Dai, Z., Guo, X., Weng, T., Wang, J., Li, Y., Feng, G., Gao, X. und He, L.** (2009). Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* **24**, 1651-61.

**Lindl, T. und Bauer, J.** (1994). Zell- und Gewebekultur. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

**Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. und Wang, Y. L.** (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* **79**, 144-52.

**Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E. und Lomasney, J. W.** (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **276**, 2758-65.

**Lorenzo, J., Choi, Y., Horowitz, M. und Takayanagi, H.** (2010). Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. London, Burlington, San Diego: Academic Press.

**Lutz, R., Sakai, T. und Chiquet, M.** (2010). Pericellular fibronectin is required for RhoA-dependent responses to cyclic strain in fibroblasts. *J Cell Sci* **123**, 1511-21.

**Mabuchi, I. und Okuno, M.** (1977). The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J Cell Biol* **74**, 251-63.

**Malone, A. M., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston, T. R., Stearns, T. und Jacobs, C. R.** (2007). Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13325-30.

**Marganski, W. A., Dembo, M. und Wang, Y. L.** (2003). Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow. *Methods Enzymol* **361**, 197-211.

**Mennenga-Klopp, E.** (2006). Kombinierte Rasterkraft-, Zugkraft- und Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mechanotransduktion in Knochenzellen. In *Fachbereich Physik*, vol. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.

**Mitra, S. K., Hanson, D. A. und Schlaepfer, D. D.** (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.

**Mogilner, A. und Oster, G.** (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* **71**, 3030-45.

**Murata-Hori, M., Suizu, F., Iwasaki, T., Kikuchi, A. und Hosoya, H.** (1999). ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS Lett* **451**, 81-4.

**Norvell, S. M., Alvarez, M., Bidwell, J. P. und Pavalko, F. M.** (2004). Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int* **75**, 396-404.

**Ogasawara, A., Arakawa, T., Kaneda, T., Takuma, T., Sato, T., Kaneko, H., Kumegawa, M. und Hakeda, Y.** (2001). Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **276**, 7048-54.

**Oliver, T., Dembo, M. und Jacobson, K.** (1999). Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes. *J Cell Biol* **145**, 589-604.

**Paszek, M. J. und Weaver, V. M.** (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 325-42.

**Pauwels, F.** (1965). Die Bedeutung der Bauprinzipien des Stütz- und Bewegungsapparates für die Beanspruchung der Röhrenknochen. *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

**Pelham, R. J., Jr. und Wang, Y. L.** (1998). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol Bull* **194**, 348-9; discussion 349-50.

**Peskin, C. S., Odell, G. M. und Oster, G. F.** (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J* **65**, 316-24.

**Piekarski, K. und Munro, M.** (1977). Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* **269**, 80-2.

**Pollard, T. D. und Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

**Praetorius, H. A. und Spring, K. R.** (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* **184**, 71-9.

**Prandtl, L.** (1904). Flüssigkeitsbewegung bei sehr kleiner Reibung. In *Verh. d. III. Intern. Math. Kongr. Heidelberg*.

**Puklin-Faucher, E. und Sheetz, M. P.** (2009). The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci* **122**, 179-86.

**Quinn, J. M., Sabokbar, A. und Athanasou, N. A.** (1996). Cells of the mononuclear phagocyte series differentiate into osteoclastic lacunar bone resorbing cells. *J Pathol* **179**, 106-11.

**Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M. und Gaub, H. E.** (1992). From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* **257**, 1900-5.

**Ralston, S. H.** (1997). The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br J Rheumatol* **36**, 831-8.

**Rappaport, R.** (1986). Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol* **105**, 245-81.

**Rawlinson, S. C., el-Haj, A. J., Minter, S. L., Tavares, I. A., Bennett, A. und Lanyon, L. E.** (1991). Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling? *J Bone Miner Res* **6**, 1345-51.

**Reich, K. M., Gay, C. V. und Frangos, J. A.** (1990). Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol* **143**, 100-4.

**Rieger, T.** (2004). Einfluss fluider Scherspannungen auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten. In *Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik*, vol. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.

**Robinson, J. A., Chatterjee-Kishore, M., Yaworsky, P. J., Cullen, D. M., Zhao, W., Li, C., Kharode, Y., Sauter, L., Babij, P., Brown, E. L. et al.** (2006). Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* **281**, 31720-8.

**Robling, A. G., Burr, D. B. und Turner, C. H.** (2000). Partitioning a daily mechanical stimulus into discrete loading bouts improves the osteogenic response to loading. *J Bone Miner Res* **15**, 1596-602.

**Rotta, J. C.** (1972). *Turbulente Strömungen*. Stuttgart: Teubner.

**Roux, W.** (1895). *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen*. Leipzig: Engelmann-Verlag.

**Rubin, C., Recker, R., Cullen, D., Ryaby, J., McCabe, J. und McLeod, K.** (2004). Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* **19**, 343-51.

**Rubin, J., Murphy, T. C., Rahnert, J., Song, H., Nanes, M. S., Greenfield, E. M., Jo, H. und Fan, X.** (2006a). Mechanical inhibition of RANKL expression is regulated by H-Ras-GTPase. *J Biol Chem* **281**, 1412-8.

**Rubin, J., Rubin, C. und Jacobs, C. R.** (2006b). Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* **367**, 1-16.

**Rubinstein, B., Fournier, M. F., Jacobson, K., Verkhovsky, A. B. und Mogilner, A.** (2009). Actin-myosin viscoelastic flow in the keratocyte lamellipod. *Biophys J* **97**, 1853-63.

**Rucci, N.** (2008). Molecular biology of bone remodelling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* **2008** **5**, 49-56.

**Ryder, K. D. und Duncan, R. L.** (2001). Parathyroid hormone enhances fluid shear-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signaling in osteoblastic cells through activation of mechanosensitive and voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels. *J Bone Miner Res* **16**, 240-8.

**Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M. und Hidaka, H.** (1987). Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **262**, 7796-801.

**Salter, D. M., Robb, J. E. und Wright, M. O.** (1997). Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction. *J Bone Miner Res* **12**, 1133-41.

**Satcher, R. L., Jr., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A., Jr. und Dewey, C. F., Jr.** (1992). The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics. *J Biomech Eng* **114**, 309-16.

**Schafer, A. und Radmacher, M.** (2005). Influence of myosin II activity on stiffness of fibroblast cells. *Acta Biomater* **1**, 273-80.



**Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. und Sieg, D. J.** (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78.

**Schlichting, H. und Gersten, K.** (2006). Grenzschichttheorie. Karlsruhe: Verlag G. Braun.

**Schlichting, H. und Truckenbrodt, E.** (1967). Aerodynamik des Flugzeuges. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

**Schmenn, T.** (2012, unveröffentlicht). Zugkraftvergleichsanalyse von primären Osteoblasten und Osteosarkomzellen in Ruhe und nach mechanischer Belastung. In *Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik*, vol. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität.

**Schwartz, M. A.** (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a005066.

**Sellers, J. R.** (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22.

**Skerry, T. M.** (2006). One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**, 122-7.

**Smalt, R., Mitchell, F. T., Howard, R. L. und Chambers, T. J.** (1997). Mechanotransduction in bone cells: induction of nitric oxide and prostaglandin synthesis by fluid shear stress, but not by mechanical strain. *Adv Exp Med Biol* **433**, 311-4.

**Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V.** (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-58.

**Spector, D., Goldman, R. und Leinwand, L.** (1998). Cells : A Laboratory Manual. Volume 1. Culture And Biochemical Analysis Of Cells. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Stamenovic, D., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrelykke, I. M., Chen, J. und Wang, N.** (2002). Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C617-24.

**Struckmeier, J., Klopp, E., Born, M., Hofmann, M., Rink, D., Jones, D. und Butt, H.** (2001). Real-time atomic force fluorescence microscopy on living cells. *SPIE* **4434**, 142-149.

**Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B. und Kung, C.** (1997). Mechanosensitive channels of Escherichia coli: the MscL gene, protein, and activities. *Annu Rev Physiol* **59**, 633-57.

**Tan, L., Meyer, T., Pfau, B., Hofmann, T., Tan, T. W. und Jones, D.** (2010). Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **10**, 92-9.

**Tavella, S., Ruggiu, A., Giuliani, A., Brun, F., Canciani, B., Manescu, A., Marozzi, K., Cilli, M., Costa, D., Liu, Y. et al.** (2012). Bone turnover in wild type and pleiotrophin-transgenic mice housed for three months in the International Space Station (ISS). *PLoS One* **7**, e33179.

**Toma, C. D., Ashkar, S., Gray, M. L., Schaffer, J. L. und Gerstenfeld, L. C.** (1997). Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **12**, 1626-36.

**Tonna, E. A. und Lampen, N. M.** (1972). Electron microscopy of aging skeletal cells. I. Centrioles and solitary cilia. *J Gerontol* **27**, 316-24.

**Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D. J., Sasaki, Y. und Matsumura, F.** (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **150**, 797-806.

**Usami, S., Chen, H. H., Zhao, Y., Chien, S. und Skalak, R.** (1993). Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann Biomed Eng* **21**, 77-83.

**van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P. und Lowik, C. W.** (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* **199**, 805-14.

**Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Komm, S. G. und Olshevskaja, L. V.** (1970). Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol* **24**, 625-40.

**Wadhwa, S., Choudhary, S., Voznesensky, M., Epstein, M., Raisz, L. und Pilbeam, C.** (2002). Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 46-51.

**Wang, H. B., Dembo, M., Hanks, S. K. und Wang, Y.** (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11295-300.

**Wang, H. B., Dembo, M. und Wang, Y. L.** (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1345-50.

**Wang, L., Ciani, C., Doty, S. B. und Fritton, S. P.** (2004). Delineating bone's interstitial fluid pathway in vivo. *Bone* **34**, 499-509.

**Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y. und Chien, S.** (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* **434**, 1040-5.

**Wang, Y. L. und Pelham, R. J., Jr.** (1998). Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol* **298**, 489-96.

**Weinbaum, S., Cowin, S. C. und Zeng, Y.** (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* **27**, 339-60.

**Weyts, F. A., Li, Y. S., van Leeuwen, J., Weinans, H. und Chien, S.** (2002). ERK activation and alpha v beta 3 integrin signaling through Shc recruitment in response to mechanical stimulation in human osteoblasts. *J Cell Biochem* **87**, 85-92.

**Wibel, W.** (2008). Untersuchungen zu laminarer, transitioneller und turbulenter Strömung in rechteckigen Mikrokanälen. In *Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen*, vol. Dissertation. Dortmund: Technischen Universität.

**Wiltink, A., Nijweide, P. J., Scheenen, W. J., Ypey, D. L. und Van Duijn, B.** (1995). Cell membrane stretch in osteoclasts triggers a self-reinforcing Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *Pflugers Arch* **429**, 663-71.

**Wolf, J.** (1892). Das Gesetz der Transformation der Knochen. In *Hirchwild*. Berlin.

**Wong, G.** (1990). Isolation and Behavior of Isolated Bone-Forming Cells. The Osteoblast and the Osteocyte. *Telford Press* **494**.

**Xiao, Z., Zhang, S., Mahlios, J., Zhou, G., Magenheimer, B. S., Guo, D., Dallas, S. L., Maser, R., Calvet, J. P., Bonewald, L. et al.** (2006). Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* **281**, 30884-95.

**Yam, P. T., Wilson, C. A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E. L., Dye, N. A., Wiseman, P. W., Danuser, G. und Theriot, J. A.** (2007). Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol* **178**, 1207-21.

**Yang, C. M., Chien, C. S., Yao, C. C., Hsiao, L. D., Huang, Y. C. und Wu, C. B.** (2004). Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem* **279**, 22158-65.

**Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A. et al.** (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3597-602.

**You, J., Reilly, G. C., Zhen, X., Yellowley, C. E., Chen, Q., Donahue, H. J. und Jacobs, C. R.** (2001). Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem* **276**, 13365-71.

**Zaidi, M.** (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* **13**, 791-801.

**Zhang, S., Cheng, J. und Qin, Y. X.** (2012). Mechanobiological modulation of cytoskeleton and calcium influx in osteoblastic cells by short-term focused acoustic radiation force. *PLoS One* **7**, e38343.

**Zimmerman, D., Jin, F., Leboy, P., Hardy, S. und Damsky, C.** (2000). Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev Biol* **220**, 2-15.

**Zimmermann, K. W.** (1898). Beiträge zur Kenntniss einiger Drüsen und Epithelien. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **52**, 552-706.

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: FOKALE ADHÄSION .....	9
ABBILDUNG 2: BROWN'SCHE RATSCHEN .....	11
ABBILDUNG 3: ANNÄHERND LINEARE ABHÄNGIGKEIT DES ELASTIZITÄTSMODULS VON DER BIS-ACRYLAMIDKONZENTRATION .....	25
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RASTERKRAFTMIKROSKOPS .....	26
ABBILDUNG 5: VERSCHIEBUNG DER INTENSITÄTSMUSTER .....	32
ABBILDUNG 6: DEFORMATIONSMATRIX MIT KRAFTVEKTOREN UND IHREM URSPRUNGSKNOTEN .....	34
ABBILDUNG 7: GRAPHISCHE AUSGABE DER LIBTRC-SOFTWARE .....	36
ABBILDUNG 8: GESCHWINDIGKEITSPROFIL ZWISCHEN EINER FESTSTEHENDEN UND EINER SCHWIMMENDEN PLATTE .....	38
ABBILDUNG 9: GESCHWINDIGKEITSPROFIL ZWISCHEN ZWEI FESTSTEHENDEN PLATTEN .....	39
ABBILDUNG 10: FLUSSKAMMER .....	44
ABBILDUNG 11: FLÜSSIGKEITSRESERVOIR .....	45
ABBILDUNG 12: VERSUCHSAUFBAU .....	46
ABBILDUNG 13: MITTELWERTE DER ZELLFLÄCHEN.....	49
ABBILDUNG 14: PHASENKONTRASTAUFNAHMEN EINES OSTEOLASTEN.....	50
ABBILDUNG 15: HISTOGRAMME DER KONTROLLGRUPPE .....	51
ABBILDUNG 16: HISTOGRAMME VERSUCHSGRUPPE.....	52
ABBILDUNG 17: KRAFTMITTELWERTE DER KONTROLL- UND VERSUCHSGRUPPE .....	53
ABBILDUNG 18: REAKTIONSTYPEN DER GRUPPEN .....	55
ABBILDUNG 19: KRAFTVERLAUF BEIDER GRUPPEN ÜBER DIE ZEIT .....	56
ABBILDUNG 20: KRAFTVERLAUF ÜBER DIE ZEIT DER REAKTIONSTYPEN BEI DER KONTROLLGRUPPE .....	57
ABBILDUNG 21: KRAFTVERLAUF ÜBER DIE ZEIT DER EINZELZELLEN BEI DER KONTROLLGRUPPE .....	59

ABBILDUNG 22 KRAFTVERLAUF ÜBER DIE ZEIT DER REAKTIONSTYPEN DER VERSUCHSGRUPPE .....	60
ABBILDUNG 23: KRAFTVERLAUF ÜBER DIE ZEIT DER EINZELZELLEN BEI DER VERSUCHSGRUPPE .....	61

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN.....	18
TABELLE 2: VERWENDETE LÖSUNGEN.....	19
TABELLE 3: VERWENDETE MEDIEN .....	20
TABELLE 4: MATERIALIEN FÜR DIE OBJEKTTRÄGERBEHANDLUNG .....	21
TABELLE 5: MATERIALIEN FÜR DIE POLYACRYLAMIDGELE .....	23
TABELLE 6: MATERIALIEN FÜR DIE KOLLAGENBESCHICHTUNG.....	24
TABELLE 7: MATERIALIEN FÜR DAS ABLÖSEN DER ZELLEN .....	29
TABELLE 8: MATERIALIEN FÜR DIE KRYOKONSERVIERUNG.....	30
TABELLE 9: ANTIKÖRPER FÜR DIE PHÄNOTYPISIERUNG .....	31
TABELLE 10: VERWENDETE CCD-KAMERAS .....	43
TABELLE 11: MATERIALIEN FÜR DIE VERSUCHSGRUPPE .....	42
TABELLE 12: GRUPPENBILDUNG DER KONTROLL- UND VERSUCHSGRUPPE.....	48
TABELLE 13: ZELLFLÄCHENMITTELWERTE MIT STANDARDABWEICHUNG (SD)...	49
TABELLE 14: KRAFTMITTELWERTE MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) .....	53
TABELLE 15: REAKTIONSTYPEN BEI DER KONTROLLGRUPPE.....	54
TABELLE 16: REAKTIONSTYPEN BEI DER VERSUCHSGRUPPE .....	55

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen/Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Behr, Berger, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dominguez, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fruhstorfer, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Gress, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jones, Jungclas, Kern, Kienapfel, Klenk, Klingmüller, Klose, Köhler, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lang, Lange, Lengsfeld, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Max, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seitz, Sommer, Steiniger, Stiletto, Suske, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilke, Wirth, Wulf



## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. David B. Jones für die Überlassung dieses Themas für meine Dissertation und für die Unterstützung bei fachlichen Problemen. Besonderer Dank gilt den beiden medizinisch-technischen Assistenten Weng Tan und Marita Kratz für die Einführung im Labor und Hilfestellung bei praktischen Problemen sowie Marian Steinert für seine Korrekturen. Ich danke Sami Curtze für die Unterstützung in der Auswertung der Zugkraftmessungen sowie Torsten Pohl für die Konstruktion der Parallelflosskammer.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und Freunden, die mich im Entstehungsprozess dieser Arbeit unterstützt haben.